

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Daniel Nedvěd

Transport cytokininů přes plasmatickou membránu

Mechanism of cytokinin transport across plasma membrane

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: Bc. Ing. Klára Hoyerová, Ph.D.

Praha 2018

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a Bc. Ing. Kláry Hoyerové, Phd. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 24. 5. 2018

---

Daniel Nedvěd, v. r.

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., Bc. Ing. Kláře Hoyerové, Ph.D. a Mgr. Petru Klímovi, Ph.D. za jejich ochotu a čas, který věnovali pročtení této práce. Dále děkuji Ing. Robertě Filipové, Mgr. Zuzaně Vondrákové a Ing. Karlu Müllerovi, Ph.D. za jejich pomoc v laboratoři a Ing. Petre I. Dobrevovi, CSc. za analýzu vzorků. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu.

## Abstrakt

Cytokinininy tvoří jednu z hlavních skupin fytohormonů, signálních molekul účastnících se zásadních fyziologických procesů rostlin. Regulace jejich působení je nejčastěji spojována s metabolickými přeměnami, nedávná identifikace membránových proteinů AtABCG14 a AtPUP14 jako selektivních cytokininových přenašečů však otevřela otázku možného vlivu polárního membránového transportu na řízení cytokininové signalizace. S využitím akumulace radioaktivně značených cytokininů v transgenní buněčné kultuře BY-2 jsme studovali kinetiku přenosu cytokininů pomocí přenašečů AtABCG14 a AtPUP14 na buněčné úrovni a případné metabolické změny spojené se zvýšenou expresí těchto přenašečů.

Zvýšená exprese přenašeče AtPUP14 se projevila na zvýšení akumulace značených cytokininů ve formě ribosidů i volných bází. Zvýšení exprese tohoto přenašeče nemělo žádný vliv na metabolismus značených cytokininů. Zvýšená exprese přenašeče AtABCG14 se na akumulaci značených cytokininů v buňkách BY-2 neprojevila.

Klíčová slova: cytokinin, transport, plasmatická membrána, přenašeč PUP14, tabák, buněčná kultura BY-2

# Abstract

Cytokinins are one of major groups of phytohormones, signaling molecules participating on the crucial physiological processes of plants. Regulation of their function is mostly associated with metabolic changes, recent identification of membrane proteins AtABCG14 and AtPUP14 as selective cytokinin transporters has brought up the possibility of the regulation of cytokinin signalization via polar membrane transport, though. Using the accumulation of radioactively labeled cytokinins in transgenic BY-2 cell culture, we studied the kinetics of cytokinin transport via AtABCG14 and AtPUP14 transporters at cellular level and possible changes of cytokinin metabolism linked to elevated expression of these transporters.

Elevated expression of AtPUP14 transporter led to elevated accumulation of labeled cytokinins in form of both ribosides and free bases, while it had no effect on metabolism of labeled cytokinins. Elevated expression of AtABCG14 had no effect on accumulation of labeled cytokinins in BY-2 cells.

Keywords: cytokinin, transport, plasmatic membrane, transporter PUP14, tobacco, suspension cultured BY-2 cells

(In Czech)

# Obsah

1 Seznam použitých zkratk.....	7
2 Úvod.....	9
2.1 Objev, charakteristika a základní vlastnosti.....	9
2.2 Metabolismus cytokininů.....	10
2.2.1 Biosyntéza.....	10
2.2.2 Konjugace.....	13
2.2.3 Degradace.....	15
2.3 Cytokininová signální dráha.....	15
2.3.1 Receptory.....	15
2.3.2 Další složky signální kaskády.....	17
2.4 Transport cytokininů.....	18
2.4.1 Translokace vodivými pletiví.....	18
2.4.2 Potenciální membránové přenašeče cytokininů.....	20
3 Cíle práce.....	24
4 Materiál a metody.....	25
4.1 Materiál.....	25
4.1.1 Rostlinný materiál.....	25
4.1.2 Chemikálie.....	25
4.1.3 Přístrojové vybavení.....	26
4.2 Metody.....	27
4.2.1 Mikroskopické techniky.....	27
4.2.2 Ověření exprese přenašečů AtABCG14 a AtPUP14 kvantitativní RT-PCR.....	27
4.2.3 Akumulační experimenty.....	29
4.2.4 Sledování metabolických přeměn cytokininů.....	30
5 Výsledky.....	31
5.1 Exprese AtABCG14 a AtPUP14.....	31
5.2 Akumulační pokusy.....	32
5.3 Metabolismus značených cytokininů během akumulace.....	36
6 Diskuse.....	39
7 Závěr.....	41
8 Seznam použité literatury.....	42

# 1 Seznam použitých zkratek

ABC	„ATP-binding cassette“ (anglicky)
Ade	adenin
ADP	adenosindifosfát
AHK	histidinová kinasa z <i>Arabidopsis</i>
AHP	histidinová transferasa z <i>Arabidopsis</i>
AMP	adenosinmonofosfát
At	huseníček rolní ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
ATP	adenosintrifosfát
ARR	regulátor odpovědi z <i>Arabidopsis</i>
BA	benzylaminopurin
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CHASE	„Cyclase-histidin-kinase associated sensory extracellular“ (anglicky)
CIP	„Cytokinin-inducible protein“ (anglicky)
CKI	„Cytokinin independent“ (anglicky)
CKX	cytokinindehydrogenasa/oxidasa
CP	„crossing point“ (anglicky)
CRE	„Cytokinin response“ (anglicky)
CRF	„Cytokinin response factor“ (anglicky)
CYP	cytochrom P450
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EF	elongační faktor
ENT	rovnovážný nukleosidový transportér
EST	estradiol
GFP	zelený fluorescenční proetin
HMBPP	( <i>E</i> )-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrofosfát
HPK	histidinová proteinová kinasa
iP	isopentenyladenin

iP9G	isopentenyladenin-9-glukosid
IPP	isopentenylpyrofosfát
iPR	isopentenyladenosin
iPRDP	isopentenyladenosindifosfát
iPRMP	isopentenyladenosinmonofosfát
iPRTP	isopentenyladenosintrifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
LOG	„Lonely guy“ (anglicky)
KMD	„Kiss me deadly“ (anglicky)
MEP	methylerythriolfosfát
Nt	tabák virginský ( <i>Nicotiana tabacum</i> )
Os	rýže setá ( <i>Oryza sativa</i> )
PUP	purinová permeasa
RPM	otáčky za minutu
PCR	polymerasová řetězová reakce
RT	reverzní transkriptasa
TCS	„Two-component system“ (anglicky)
Tmr/Tzs	„tumor morphology root“/„ <i>trans</i> -zeatin secretion“ (anglicky)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZR	<i>trans</i> -zeatinribosid
tZRDP	<i>trans</i> -zeatinribosiddifosfát
tZRMP	<i>trans</i> -zeatinribosidmonofosfát
tZRTP	<i>trans</i> -zeatinribosidtrifosfát
UGT	uridindifosfát-dependentní glykosyltransferasa
WOL	„Wooden leg“ (anglicky)
Zm	kukuřice setá ( <i>Zea mays</i> )

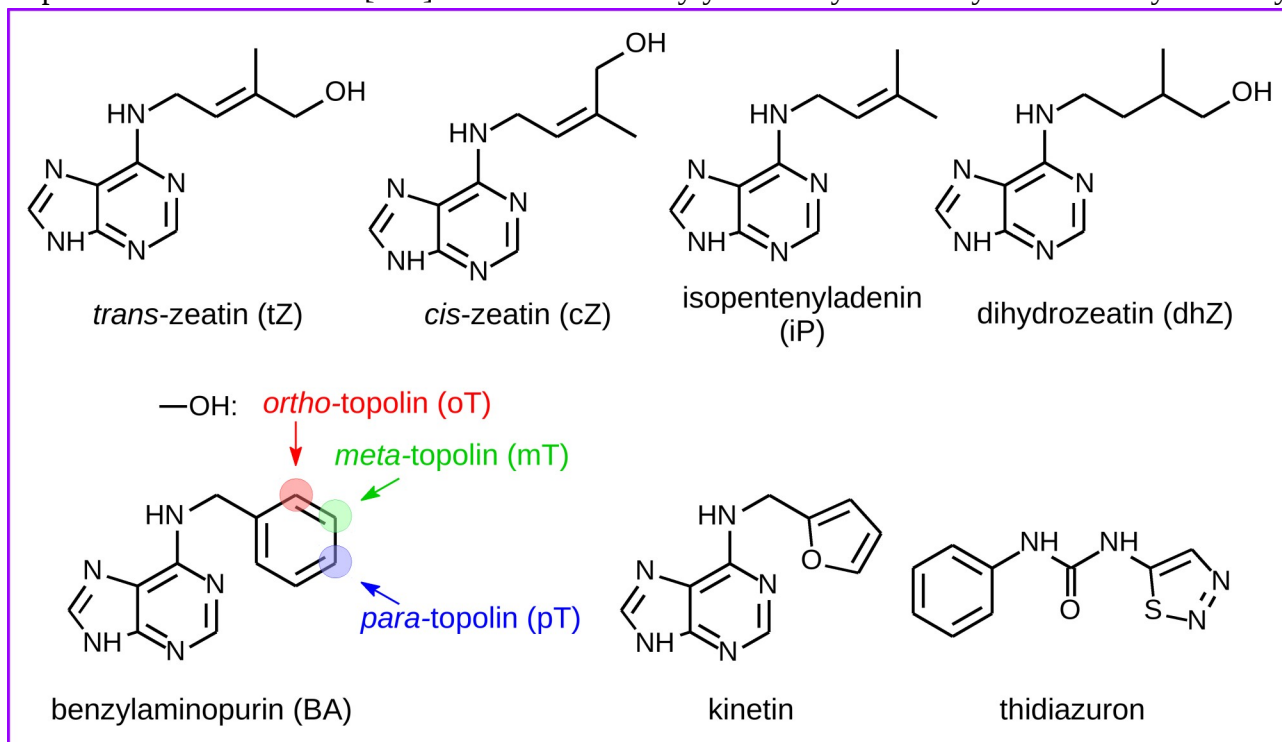


## 2 Úvod

### 2.1 Objev, charakteristika a základní vlastnosti

Cytokinininy jsou skupinou přirozeně se vyskytujících i syntetických sloučenin patřících mezi fytohormony, signální látky regulující vývoj a biologické funkce rostlin. Jejich stimulační vliv na buněčné dělení je znám od poloviny 20. století, kdy výzkumný tým C. O. Millera a F. Skooga izoloval z živočišné DNA látku nazvanou kinetin [1], později identifikovanou jako derivát adeninu, 6-furfurylaminopurin [2–4]. Jelikož kinetin nepochází z rostlinného materiálu, směřoval další výzkum k nalezení látek, které by měly podobné účinky a zároveň by byly produkovány rostlinnými buňkami. Jako první přírodní cytokinin byl objeven *trans*-zeatin (tZ), tehdy nazývaný pouze zeatin, izolovaný spolu se svými metabolity ze zrn kukuřice (*Zea mays*) [5,6].

Stejně jako v případě kinetinu lze i chemické struktury přirozeně se vyskytujících cytokininů odvodit od molekuly adeninu, na jehož atom dusíku v šesté poloze je navázán postranní řetězec charakteristický pro danou látku. Na základě povahy tohoto řetězce lze rozlišovat cytokinininy isoprenoidní a aromatické [7–9]. Vedle kinetinu byly nalezeny i další syntetické látky s účinky



Obrázek 1: Strukturní vzorce vybraných cytokininů. V prvním řádku jsou znázorněny struktury cytokininů isoprenoidních, které lze odvodit substitucí primární aminové skupiny adeninu vhodným hemiterpenem. Jako zástupce cytokininů aromatických je zde uveden benzylaminopurin, od něhož lze odvodit skupinu topolinů hydroxylací benzenového jádra v příslušných polohách (naznačeno šipkami). Kinetin a thidiazuron jsou příklady látek, které nejsou rostlinami běžně syntetizovány, avšak při exogenní aplikaci vykazují podobné účinky jako přirozeně se vyskytující cytokinininy. Sestaveno podle [2,35].

podobnými cytokinům. Jedná se např. o thidiazuron a některé další deriváty fenylnmočoviny [10]. Struktury některých cytokininů jsou znázorněny na *Obrázku 1* (strana 9).

Vedle chemické struktury se jednotlivé cytokininy mohou lišit i mírou své účinnosti (vyjádřenou např. afinitou k vybraným buněčným receptorům.) V řadě provedených biotestů byla prokázána vyšší účinnost tZ oproti jeho *cis* izomeru [11–13]. Vztah mezi těmito dvěma stereoizomery není zcela objasněn. Jejich případná izomerizace by mohla být formou regulace množství účinnějšího tZ [12,14]. Podobný děj však nebyl pozorován a je tedy možné, že se jedná o látky, jejichž metabolické pochody jsou navzájem nezávislé [15–17].

Výzkum cytokininů odhalil mnoho funkcí, které tyto fytohormony v rostlinných organismech plní. Mimo jiné byl prokázán jejich vliv na zpomalení senescence listů [18], odpovědi na abiotický i biotický stres [19,20], distribuci dusíku [21], nebo účast na různých fázích rostlinného vývoje [9,22,23].

Konkrétní účinek cytokininů tedy může být různorodý a vždy závisí na více faktorech, mezi které patří typ nebo vývojové stadium pletiva, na něž působí. Při signalizaci pomocí fytohormonů má obecně veliký význam také jejich vzájemná interakce, která se obvykle označuje anglickým termínem „crosstalking.“ Jako příklad lze uvést vzájemný vliv látek ze skupin cytokininů a auxinů (např. kyselina indolyl-3-octová) při tvorbě apikálních meristémů [2,24] nebo antagonistické působení cytokininů a kyseliny abscisové během klíčení semen [25].

Význam cytokininů se neomezuje pouze na výzkum v oblasti rostlinné biologie. V praxi se využívá specifických vlastností thidiazuronu k indukci defoliace při pěstování bavlny, což usnadňuje její sklizeň [26]. Tato látka v listech stimuluje produkci ethylenu zodpovědného za jejich následný opad [27]. Cytokininy jsou rovněž zkoumány jakožto inhibitory cyklín-dependentních kinas, které by mohly být v budoucnu využity při terapii nádorových onemocnění [28,29].

## 2.2 Metabolismus cytokininů

### 2.2.1 Biosyntéza

Společným prekurzorem hlavních cytokininů s isoprenoidním postranním řetězcem, isopentenyladeninu (iP) a tZ, je nukleotid, v němž se na molekulu ribosy váže *N*-glykosidovou vazbou v poloze 1' iP jako dusíkatá báze. Takový nukleotid se nazývá isopentenyladenosin-5'-monofosfát (iPRMP). Jelikož se jedná o formální derivát AMP, jeví se jako jedna z možných reakcí vedoucích k jeho vzniku vazba dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) na dusíkatou bázi AMP v poloze 6 [30]. Tato reakce může být katalyzována isopentenyltransferasou (IPT), která však *in*

*vivo* preferuje jako substrát ADP či ATP. DMAPP reaguje s ADP či ATP za vzniku isopentenyladenosin-5'-difosfátu (iPRDP) či isopentenyladenosin-5'-trifosfátu (iPRTP). Poté dochází k blíže nespecifikovanému odštěpení jedné či dvou fosfátových skupin za vzniku iPRMP [2,31].

IPT huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), modelového organismu rostlinné molekulární biologie (dále *Arabidopsis*), existuje v devíti různých isoformách (IPT1 – 9) s různou subcelulární lokalizací i funkcí. Isoformy IPT1, 3, 5 a 8 jsou lokalizovány v plastidech, IPT7 v mitochondriích, IPT2 a 4 v cytosolu; lokalizace IPT9 není známa [32]. S lokalizací jednotlivých forem souvisí také původ DMAPP, který může v rostlinných organismech vznikat jednak mevalonátovou cestou z acetyl-CoA v cytosolu, jednak methylerythriolfosfátovou (MEP) cestou z glyceraldehyd-3-fosfátu a pyruvátu v plastidech [33]. Vznik jednotlivých isoform IPT v *Arabidopsis* se rovněž liší v závislosti na typu pletiva a životní fázi rostliny. V juvenilním stadiu probíhá syntéza tohoto enzymu převážně v kořenech, přičemž hlavními vznikajícími isoformami jsou IPT3 a IPT5. U dospělých rostlin zůstává syntéza IPT5 lokalizovaná v kořenech, kde se rovněž tvoří IPT7, avšak IPT3 vzniká ve větší míře v nadzemní části, IPT4, 6 a 8 v plodech a IPT1 v květech [34].

Zatímco isoformy IPT1, 3 – 8 vykazují výše popsanou funkci, tj. přenášejí isopentenylový zbytek na molekulu ADP či ATP, IPT2 a 9 přenášejí tuto skupinu na tRNA, konkrétně na adeninové báze nukleotidů nacházejících se v blízkosti antikodónu [35]. Tato reakce je jedním z kroků biosyntézy CZ [36].

Pro aktivaci iP musí dojít k přeměně neaktivního iPRMP na volnou bázi [37]. Tento proces se může odehrávat dvěma způsoby. Jako první byla popsána možná dvoufázová aktivace, při které je nukleotid nejprve substrátem adenosinnukleotidasy, která štěpí fosfoesterovou vazbu v poloze 5'. Vzniklý nukleosid se nazývá isopentenyladenosin (iPR), jeho tZ analogem je *trans*-zeatinribosid (tZR). iPR je následně zpracován adenosinnukleosidasou, štěpící *N*-glykosidovou vazbu v poloze 1'. Z rostlinného materiálu byly izolovány hydrolytické enzymy schopné katalyzovat tyto dva děje [38,39], zatím však nebyly nalezeny geny, které by tyto enzymy kódovaly [40]. Ani podrobné studium rostlinných nukleosidas jejich účast na aktivaci iP neprokázalo [41].

Za hlavní metabolickou dráhu vzniku iP z iPRMP je tak považována jediná reakce, při níž dochází rovnou k hydrolýze *N*-glykosidové vazby. Tuto reakci katalyzuje enzym cytokininribosid-5'-monofosfátforibohydrolasa [42], označovaný zkratkou LOG (z anglického „Lonely guy“). V genomu *Arabidopsis* je kódováno celkem devět různých isoform tohoto enzymu (LOG1 – 9). Minimálně sedm z nich má velmi podobné účinky. Tato redundance naznačuje, že by jednokroková aktivace cytokininů mohla být významnou reakcí pro rostlinný organismus [43].

Krystalografickým určením struktury bylo zjištěno, že biologicky aktivní LOG se skládá ze dvou podjednotek, jejichž interakce vytváří kavitu pro vazbu substrátu. Funkční specifitu enzymu zajišťují postranní řetězce aminokyselinových zbytků Arg131 a Glu160, které se jednak nacházejí v dostatečné blízkosti vazebného místa pro substrát, jednak jsou zcela konzervované v rámci všech identifikovaných isoform [44]. Nedávno byly rovněž objeveny hexamerní proteiny, které by mohly na základě strukturních podobností vykazovat obdobnou aktivitu jako LOG [45].

Biosyntéza tZ z iPRMP, iPRDP či iPRTP spočívá v jejich oxidaci na postranním řetězci vázaném na adeninové bázi za vzniku tZRMP, tZRDP či tZRTP. Tuto reakci katalyzují enzymy ze skupiny cytochromů P450 (CYP), konkrétně CYP735A1 a CYP735A2 nazývané též cytokininhydroxylasy [46]. Obdobně jako v případě tvorby iP jsou tZRTP a tZRDP defosforylovány za vzniku tZRMP, který následně slouží jako substrát pro enzym LOG.

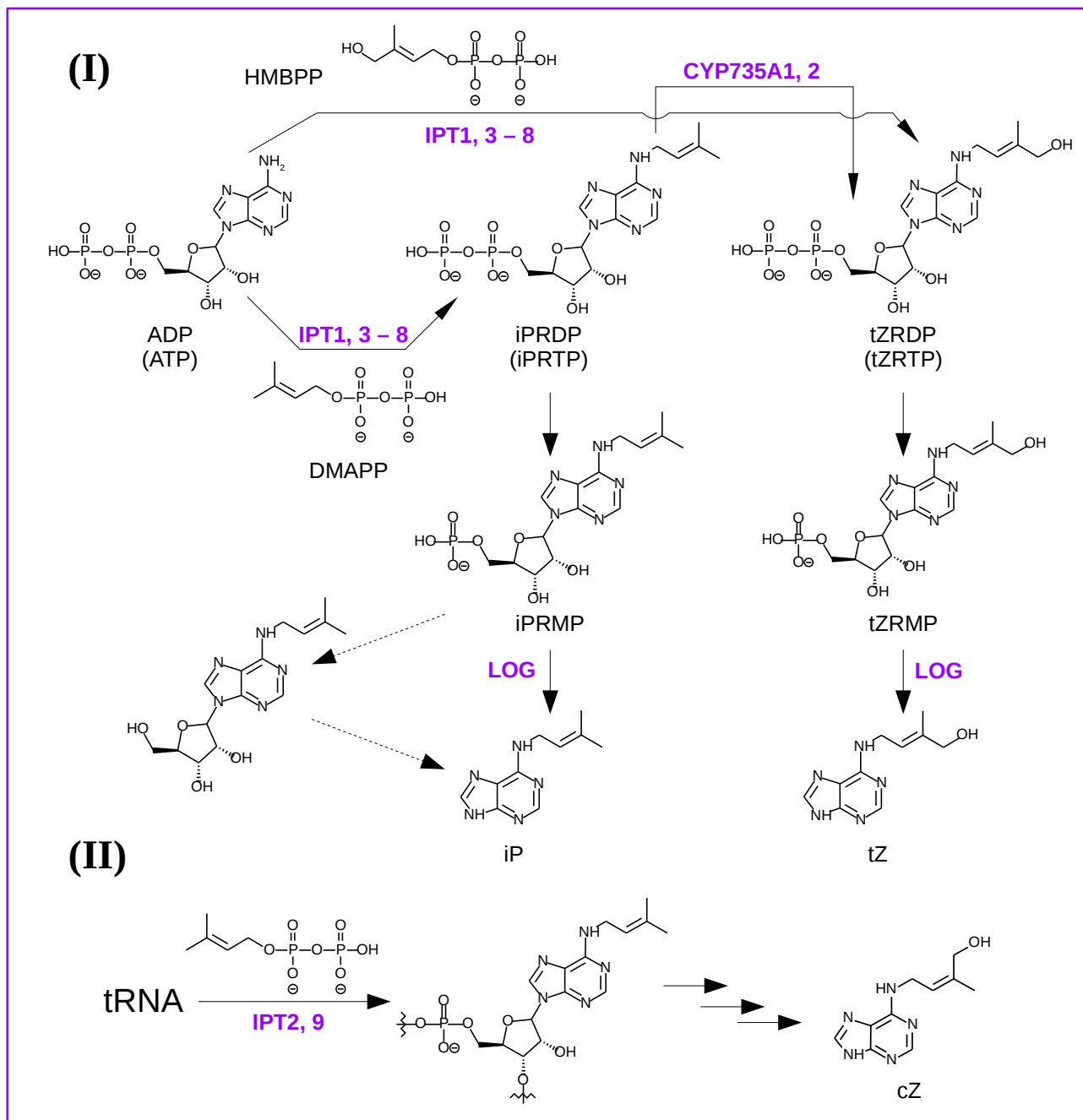
Pro tvorbu tZ byla navržena i alternativní cesta, při níž nevznikají společné prekurzory tZ a iP [47]. Jako substrát pro IPT by mohl sloužit (*E*)-4-hydroxyl-3-methyl-but-2-enpyrofosfátu (HMBPP), jehož struktura odpovídá hydroxylovanému DMAPP. Produktem takové reakce by byl přímo některý z nukleotidů vázajících tZ jako dusíkatou bázi [35]. Afinita vůči HMBPP byla zjištěna u enzymu Tmr/Tzs, který je vytvářen patogenní bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a katalyzuje podobnou reakci jako IPT. Infekce zmíněným patogenem má za následek změnu poměru koncentrací cytokininů vůči auxinům, což se projevuje růstem nádoru tvořeného nediferenciovaným pletivem. Jedním z mechanismů této změny je exprese Tmr/Tzs v buňkách hostitelské rostliny a následná syntéza tZ uvedenou alternativní biosyntetickou drahou. Tento děj je lokalizován v plastidech, kde HMBPP vzniká jako meziprodukt při syntéze DMAPP [48–51].

Afinita vůči HMBPP byla pozorována rovněž u IPT pocházející z morušovníku bílého (*Morus alba*) [35,52]. IPT jiných rostlinných druhů, včetně *Arabidopsis* [31], chmele otáčivého (*Humulus lupulus*) [53], rýže seté (*Oryza sativa*) [54] či kukuřice seté [55] vykazují substrátovou specifitu ve prospěch DMAPP.

Jak již bylo řečeno, při biosyntéze cZ dochází k prenylaci adeninové báze na tRNA za účasti specifických IPT2 a 9. V případě *Arabidopsis* probíhá tento děj v cytosolu a DMAPP, který je na adeninovou bázi přenášen, je zřejmě produktem mevalonátové dráhy, lokalizované tamtéž. Mechanismus uvolnění prenylovaného nukleotidu z tRNA není objasněn [56]. Prenylace tRNA probíhá i v jiných než rostlinných organismech, a to na specifické pozici [57]. Jednotlivé kroky vzniku tZ, iP a cZ jsou schematicky naznačeny na *Obrázku 2* (strana 13). Biosyntéza DHZ by mohla spočívat v přeměně tZ pomocí specifické NADPH-dependentní reduktasy, jejíž přítomnost byla zjištěna v embryích fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) [58].

## 2.2.2 Konjugace

Aktivní formy cytokininů jsou v rostlinném organismu udržovány ve stálém množství pomocí regulace biosyntetických pochodů a reakcí, kterými se cytokininy deaktivují. Dvěma



Obrázek 2: Biozyntéza iP a tZ (I). Prenylací ADP pomocí DMAPP vzniká iPRDP, prekurzor iP. Hydroxylací jeho postranního řetězce vzniká tZRDP, analogický prekurzor tZ. Alternativní cestou vzniku tZRDP může být prenylace ADP pomocí HMBPP. Defosforylací uvedených prekursorů vznikají nukleosidmonofosfáty iPRMP a tZRMP, které jsou v jediném kroku přeměněny na volné báze – biologicky aktivní formy cytokininů. Na příkladu iPRMP je naznačena také možná dvoukroková přeměna na volnou bázi přerušovanými šipkami. Výchozí látkou může být rovněž ATP, který podléhá analogickým procesům. Pro tento biosyntetický pochod jsou významné enzymy ze skupiny IPT, LOG, v případě tZ také CYP735A. Biosyntéza cZ (II). Specifické enzymy ze skupiny IPT prenylují pomocí DMAPP adeninovou bázi v molekule tRNA. Tato modifikovaná báze je prekurzorem pro biologicky aktivní cZ. Sestaveno podle [2,35].

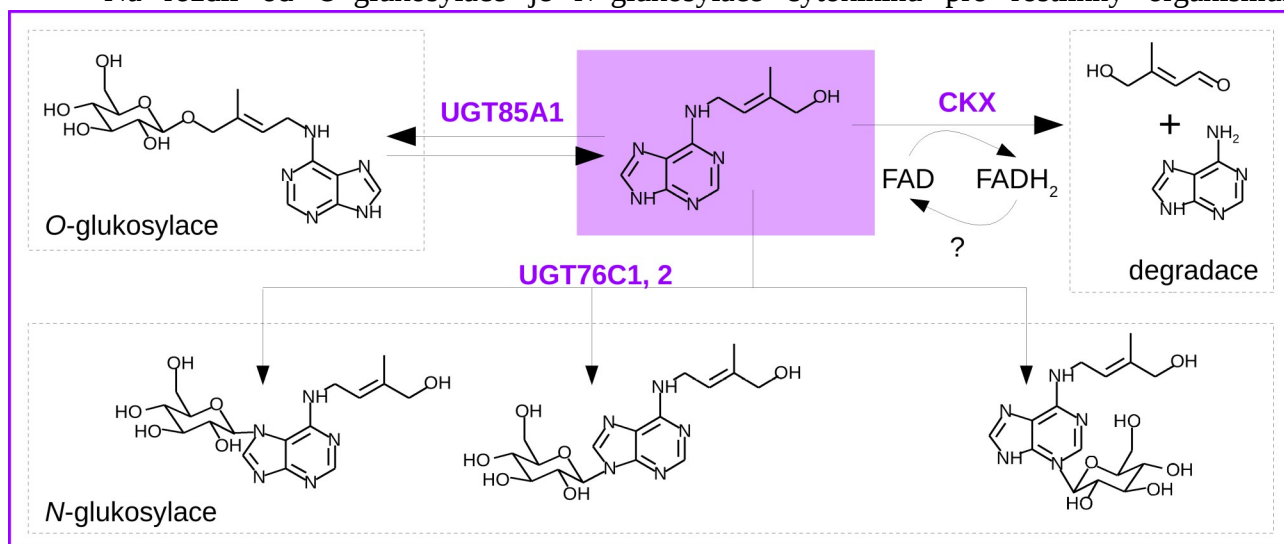
hlavními procesy deaktivace cytokininů jsou konjugace volných bází s molekulou glukosy a odštěpení postranního řetězce vázaného na adenin (viz *Obrázek 3*) [40,59,60].

Konjugace cytokininů s glukosou může proběhnout za vzniku *N*-glykosidové vazby v poloze 3, 7 či 9 nebo za vzniku *O*-glykosidové vazby mezi molekulou glukosy a postranním řetězcem tZ, cZ či DHZ. Tento typ reakce katalyzují glukosyltransferasy. Hlavní *O*-glukosyltransferasou, preferující jako substrát tZ, je UGT85A1. Zvýšená exprese genu kódujícího tento enzym má za následek nadprodukcii *O*-glukosylované formy tZ a sníženou citlivost vůči vnější aplikaci cytokininů. Koncentrace aktivní formy tZ však zůstane zachována [61]. Rovněž byly identifikovány *O*-glukosyltransferasy využívající jako majoritní substrát cZ a *cis*-zeatinribosid (cZR) [16].

*O*-glukosylované metabolity jsou uskláděny ve vakuolách, kde plní funkci zásobních forem cytokininů. Tato forma konjugace je reverzibilní, *O*-glukosylované metabolity lze převést zpět na volné báze působením  $\beta$ -glukosidasy [62,63].

Z enzymů odpovědných za *N*-glukosylaci byly identifikovány glukosyltransferasy UGT76C1 a UGT76C2. Tyto enzymy katalyzují vznik *N*-glykosidové vazby v polohách 7 a 9 a vykazují afinitu vůči tZ, DHZ, iP, BA i kinetinu [64]. Obdobně jako v případě enzymu UGT85A1 vede zvýšení exprese těchto *N*-glukosyltransferas ke hromadění *N*-glukosidů a oslabení citlivosti vůči exogenní aplikaci cytokininů. Snížení jejich exprese vede k opačným účinkům, zatímco koncentrace volných bází zůstává v obou případech prakticky nezměněná [65,66].

Na rozdíl od *O*-glukosylace je *N*-glukosylace cytokininů pro rostlinný organismus



*Obrázek 3: Biochemické přeměny aktivních cytokininů (na příkladu tZ). Volné báze mohou být inaktivovány reverzibilní *O*-glukosylací (vlevo nahoře) či ireverzibilní *N*-glukosylací (dole) probíhající v polohách 7 (vlevo), 9 (uprostřed) či 3 (vpravo). UGT85A1 je hlavní *O*-glukosyltransferasou, enzymy ze skupiny UGT76C jsou *N*-glukosyltransferasami vázajícími glukosu do polohy 7 či 9. Dalším způsobem ireverzibilní inaktivace cytokininů je jejich degradace působením enzymu CKX, jehož produkty jsou v případě tZ adenin a (E)-4-hydroxy-3-methyl-2-butenal (vpravo nahoře). Kofaktorem CKX je FAD, který se po oxidaci cytokininu reoxiduje dosud neobjasněným mechanismem. Sestaveno podle [2,35].*

ireverzibilní. V genomu patogenní bakterie *Agrobacterium rhizogenes* je však kódována glukosidasa, která je hydrolýzu *N*-glukosylovaných cytokininových metabolitů schopna katalyzovat. Prostřednictvím změny koncentrace aktivních cytokininů tak dochází k morfologickým i fyziologickým změnám v hostitelském organismu [67].

### 2.2.3 Degradace

Degradaci cytokininů za vzniku adeninu a volného postranního řetězce katalyzuje enzym cytokinindehydrogenasa/oxidasa (CKX). V různých rostlinách se vyskytuje v různém počtu isoform, které se navzájem liší v lokalizaci na úrovni subcelulárních kompartmentů či pletiv, stejně jako ve svých biochemických a katalytických vlastnostech. Tyto rozdíly by mohly být částečně dány různorodou postranslační glykosylací [68,69]. Glykosylované formy CKX jsou v porovnání s neglykosylovanými formami ve větší míře sekretovány do mezibuněčného prostoru a jejich pH optimum se nachází v kyselejší oblasti [70].

Oxidativní degradace cytokininů probíhá za redukce kofaktoru FAD přítomného v aktivním centru enzymů CKX [59,71]. Regenerace oxidované formy tohoto kofaktoru probíhá přenosem elektronů na další akceptor, jehož identita zatím není zcela známá, mohlo by se však jednat o derivát *p*-chinonu. Pomalá reoxidace redukováného kofaktoru FADH<sub>2</sub> probíhá také za aerobních podmínek, kdy se jako akceptor elektronů uplatňuje molekula kyslíku [72,73].

Ne všechny cytokininy mohou sloužit jako substrát pro CKX. Oxidativní degradace nebyla pozorována např. v případě DHZ, BA nebo glukosylovaných metabolitů [74,75].

## 2.3 Cytokininová signální dráha

### 2.3.1 Receptory

Významným objevem při studiu signální dráhy cytokininů byla identifikace membránového proteinu CKI1, jehož zvýšená exprese má za následek stejné projevy jako exogenní aplikace cytokininů [76]. V sekvenci CKI1 byly nalezeny úseky shodné s histidinovou proteinovou kinasou (HPK), membránovým receptorem charakteristickým pro prokaryota a nižší eukaryota. HPK může být součástí řady signálních kaskád, z nichž nejjednodušší je tzv. dvousložkový systém (TCS). V rámci vyšších eukaryot bylo využití dvousložkového systému jako signální dráhy a HPK jako receptoru popsáno pouze u rostlin [77].

Dvousložkový systém je obecně aktivován vazbou ligandu na HPK sloužící jako receptor, což vede k její dimerizaci a následné autofosforylaci konzervovaného His zbytku za spotřeby ATP. Fosforylovaná HPK dále přenáší fosfátovou skupinu na konzervovaný Asp zbytek. Přenos fosfátové

skupiny mezi His a Asp zbytky se může v rámci signální kaskády odehrát několikrát [78,79].

Přestože CKI1 svou činností ovlivňuje další prvky signální dráhy cytokininů, není jejich receptorem a jeho role v signalizaci prostřednictvím cytokininů není zcela objasněna [80,81]. První pravý cytokininový receptor, CRE1/WOL/AHK4 objevily v genomu *Arabidopsis* nezávisle na sobě tři výzkumné skupiny [82–84]. Ve stejném organismu byly dále nalezeny i receptory AHK2 a AHK3 [85]. Vazba ligandu je v případě všech tří zmíněných receptorů zprostředkována extracelulární doménou CHASE [86,87].

Pro charakteristiku jednotlivých receptorů byla řadou metod testována jejich afinita vůči různým cytokininům i jejich metabolitům. Za využití bakteriálního systému (*Escherichia coli*) exprimujícího CRE1/WOL/AHK4 a AHK3 byla v případě prvního zmíněného receptoru pozorována preference tZ a iP jako substrátů. Obě tyto látky byly vázány s podobnou afinitou. Z testovaných derivátů tZ byl vázán tZR, avšak s daleko nižší afinitou než v případě volné báze. Receptor AHK3 se naproti tomu jevil jako méně specifický, vykazoval rovněž afinitu vůči cZ či DHZ a vazba tZR u něj vyvolala odpověď srovnatelnou s vazbou volné báze. Další jeho odlišností oproti CRE1/WOL/AHK4 byla preference tZ na úkor iP [12].

Obdobné experimenty byly provedeny i s cytokininovými receptory kódovanými v genomu *Zea mays*, konkrétně s receptory ZmHK1, ZmHK2 a ZmHK3, ortologickými s CRE1/WOL/AHK4, AHK3 a AHK2. Receptor ZmHK2 vykazoval preferenci tZ a tZR oproti iP, což se shoduje s údaji získanými v případě AHK3. ZmHK2 rovněž vázal cZ a cZR s podobnou afinitou jako iP. ZmHK1 vykazoval v porovnání s CRE1/WOL/AHK4 výraznou preferenci iP na úkor tZ a vyšší afinitu vůči cZ než CRE1/WOL/AHK4 [10,88]. Obecně vysoká afinita receptorů typu ZmHK vůči cZ by mohla svědčit o fyziologickém významu této látky pro *Zea mays*. Tuto myšlenku podporují i experimenty prokazující vysoké zastoupení cZ v této rostlině [15,89] nebo přítomnost genu pro specifickou O-glukosyltransferasu cizZOG1 [90].

Specifita cytokininových receptorů z *Arabidopsis* byla rovněž zkoumána *in planta*. Tyto experimenty odhalily značnou podobnost v substrátové specifitě AHK2 a CRE1/WOL/AHK4 a potvrdily výše popsané rozdíly v afinitě vůči tZ a iP [91]. Jednotlivé receptory se také liší svou lokalizací v rámci organismu; CRE1/WOL/AHK4 je exprimován především v kořenech, zatímco AHK3 ve významné míře i v nadzemní části [92]. Tato skutečnost by mohla souviset s možnou komunikací kořenů a nadzemní části rostliny prostřednictvím usměrněného transportu tZ xylémem a iP floémem [93]. Bylo navrženo, že AHK3 plní v nadzemní části rostliny funkci příjemce signálu z kořenů ve formě tZ [94].



### 2.3.2 Další složky signální kaskády

Vazba cytokininu na některý z receptorů vede nejprve k autofosforylaci konzervovaných His zbytků a následně k přenosu fosfátové skupiny na Asp zbytky nacházející se na efektorové doméně [35]. Receptor může v takovou chvíli fungovat jako kinasa fosforylující His zbytek na jiném proteinu [95,96]. V genomu *Arabidopsis* byly nalezeny fosfotransferové proteiny (AHP1-5), které po interakci s cytokininovými membránovými receptory přenášejí fosfátovou skupinu do buněčného jádra, kde následně další fosforylací aktivují tzv. regulátory odpovědi (ARR) [85]. Translokace proteinů AHP mezi cytoplasmou a jádrem je nezávislá na cytokininovém signálu [97]. Schema celé signální dráhy cytokininů je znázorněno na *Obrázku 4* (strana 18).

Zvláštní úlohu má tzv. pseudofosfotranferový protein AHP6. V jeho přítomnosti dochází k oslabení cytokininového signálu, což je zřejmě způsobeno soutěží s AHP1-5 o aktivované cytokininové receptory [98,99].

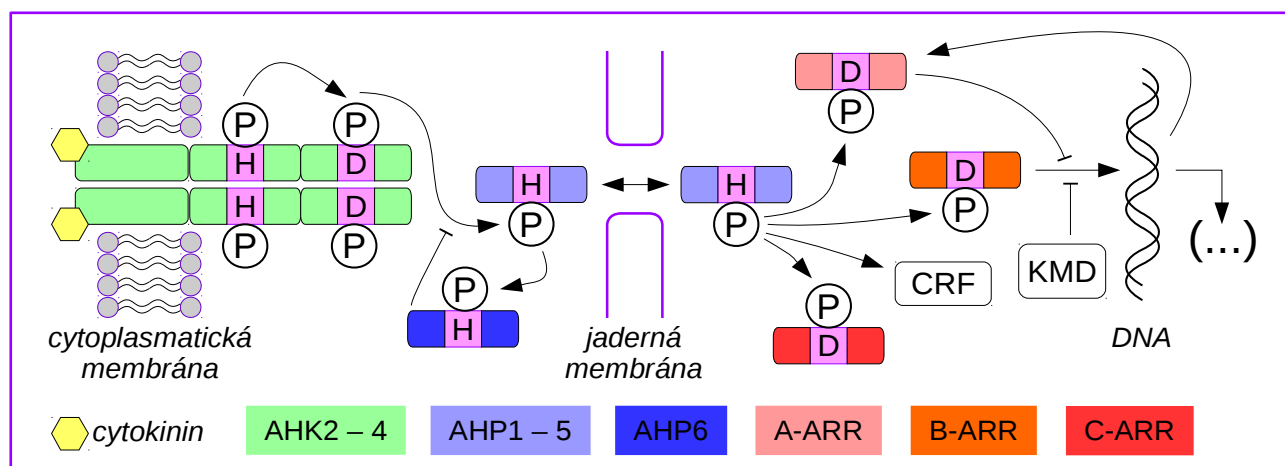
Mutantní organismy postrádající schopnost exprimovat jeden z proteinů AHP1-5 nevykazovaly výrazné změny, což naznačuje, že funkce fosfotransferových proteinů v cytokininové signalizaci se alespoň do určité míry překrývají. Mutace *ahp4* se v některých případech projevila zvýšenou citlivostí vůči exogenně aplikovaným cytokininům, z čehož lze usoudit, že AHP4 funguje také jako inhibitor příslušných procesů [100].

Poměrně široká skupina regulátorů odpovědi v genomu *Arabidopsis* se v současné době rozděluje na typy A (A-ARR), B (B-ARR) a C (C-ARR) [2,101]. B-ARR plní funkci transkripčních faktorů [22]. V jejich sekvenci byly identifikovány dva výrazné segmenty – jeden z nich je odpovědný za jadernou lokalizaci a zajišťuje vazbu mezi B-ARR a specifickým úsekem DNA, druhý je bohatý na Pro a Gln a podílí se na transaktivaci [102–105]. Oba tyto úseky jsou součástí tzv. výstupní, C-terminální domény, zatímco N-terminální doména B-ARR transkripčních faktorů je odpovědná za příjem signálu [106].

A-ARR ve své sekvenci obsahují vedle N-terminální domény, přijímající signál, variabilní C-terminální zakončení, které je kratší než výstupní doména charakteristická pro B-ARR. Úsek zprostředkovávající vazbu s DNA tato skupina regulátorů odpovědi nemá [107]. A-ARR mohou být lokalizovány jak v jádře, tak v cytoplazmě. V případě ARR7 a ARR15 byly v rámci C-terminálního zakončení nalezeny sekvence zodpovědné za jadernou lokalizaci [108,109]. A-ARR mohou mít stimulující i inhibiční vliv na citlivost buněk vůči cytokininovému signálu [110,111]. Část těchto proteinů je také působením cytokininů stabilizována [112,113]. Exprese A-ARR inhibujících přenos cytokininového signálu může být stimulována působením B-ARR, což představuje jeden z mechanismů regulace působení cytokininů negativní zpětnou vazbou. Dalším takovým příkladem

je stimulační působení B-ARR na expresi KMD, F-box proteinu odpovědného za degradaci B-ARR proteasomem [2,114,115].

Mezi C-ARR patří ARR22 a ARR24, které se svou *N*-terminální doménou liší od ostatních dvou typů. Jde o relativně nově definovanou skupinu, jejíž funkce zatím nebyla přesvědčivě objasněna [116,117]. Na cytokininový signál reaguje také další typ transkripčních faktorů označovaný jako CRF, jehož přesná funkce rovněž není známa [118–120].



Obrázek 4: Model cytokininové signalizační dráhy navržený pro *Arabidopsis thaliana*. Vazba cytokininu na dimerní receptor (AHK2 – 4) vyvolá autofosforylaci His (H) zbytků, z nichž se fosfátová skupina přenáší na zbytky Asp (D) na efektorové doméně receptoru. Následuje fosforylace fosfotransferových proteinů (AHP1 – 5) schopných translokace do buněčného jádra. O fosfátovou skupinu s nimi soutěží protein AHP6, který plní funkci inhibitoru cytokininového signálu. V buněčném jádře mohou být aktivovány transkripční faktory B-ARR spolu se svými inhibitory A-ARR a proteiny ze skupiny C-ARR či CFR, jejichž funkce zatím nebyla zcela objasněna. Transkripční aktivita B-ARR je dále reprimována F-box proteiny KMD. B-ARR stimulují expresi řady genů, mezi nimiž jsou také geny pro A-ARR, čímž je zajištěna regulace jejich aktivity negativním zpětnovazebním mechanismem. Sestaveno podle [2,35].

## 2.4 Transport cytokininů

### 2.4.1 Translokace vodivými pletivy

Jak již bylo řečeno v odstavci 2.3.1, cytokinininy mohou být v rámci rostlinného organismu přenášeny na dlouhou vzdálenost prostřednictvím vodivých pletiv xylému a floému. Distribuce cytokininů vodivými pletivy byla studována s využitím jejich radioaktivně značených analogů [121,122]. V xylému, který vede látky z kořenů do nadzemních částí tzv. transpiračním proudem, jsou nejvíce zastoupeny tZR a tZ, zatímco ve floému převažují iPR a iP, přičemž v obou případech převládá forma ribosidu nad volnou bází [93,123].

Transport cytokininů na dlouhou vzdálenost byl také zkoumán pomocí metod využívajících různého roubování mutovaných a nemutovaných částí rostlin. Např. při studiu efektu nadprodukce enzymů IPT v rostlinách tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) byl roubován transgenní prýt na divoký kořenový systém a naopak. Během těchto experimentů byly pozorovány dva fenotypové

projevy typické pro zvýšenou hladinu cytokininů – stimulace senescence listů a represe apikální dominance projevující se proliferací postranních pupenů. K oběma těmto jevům docházelo v transgenních částech roubovaných rostlin, avšak ani v jednom případě nebyly přeneseny do nemodifikovaných pletiv. Je tedy možné, že při zmíněných fyziologických procesech působí cytokininy především parakrinně [9,124].

Při jiném experimentu byly studovány fenotypové projevy a koncentrace cytokininů po čtyřnásobné delecí genů pro IPT. Transgenní rostliny *Arabidopsis* vykazující mutaci *atipt1;3;5;7* měly v porovnání s nemutovanými jedinci méně vzrostlou nadzemní část a delší kořeny, avšak jejich primární kořen byl tenčí; tento poslední projev je důsledkem absence kambia, dělivého pletiva zodpovědného za sekundární tloušťnutí. Koncentrace iPR, iPRMP, tZR i tZRMP sledované během tohoto experimentu byly v případě transgenních organismů nižší, a to jak v nadzemní části, tak i v kořenech. Naroubování transgenního prýtu na divoké kořeny mělo za následek zvýšení koncentrace metabolitů tZ v nadzemní části na přibližně stejnou úroveň, jaká byla pozorována u nemodifikovaných jedinců, koncentrace metabolitů iP však zůstala nezměněná. Naroubování divokého prýtu na transgenní kořeny vedlo analogicky k opačnému výsledku – koncentrace metabolitů iP v kořenech byla dorovnána na běžnou úroveň, zatímco koncentrace metabolitů tZ zůstala snižena. Fenotypový projev obou typů roubovaných rostlin odpovídal projevu nemodifikovaných jedinců [125].

Výsledky tohoto experimentu potvrzují hypotetický model, podle něhož jsou iP a jeho metabolity dopravovány vodivými pletivy především z nadzemní části rostliny do kořenů, zatímco tZ a jeho metabolity putují opačným směrem [40]. K podobným závěrům vedlo také studium vlivu mutace genů pro enzymy CYP735A1 a CYP735A2 [126].

Translokace cytokininů za účasti vodivých pletiv je regulována řadou faktorů, mezi něž patří dostupnost dusíku v okolí, přítomného např. ve formě dusičnanů. Exogenní přídavky dusičnanů vedly ke zvýšení toku tZ a jeho metabolitů xylémem i ke zvýšení jejich akumulace v pletivech [127,128]. Dále byl pozorován vliv dusičnanů a amonných iontů na akumulaci proteinu ZmCIP1, jehož syntézu cytokininy stimulují. Podání obou forem dusíku izolovaným listům nemělo na koncentraci tohoto proteinu žádný vliv. V případě celistvých rostlin však po exogenní aplikaci dusičnanů a amonných iontů jeho koncentrace vzrostla [129].

Pojícím prvkem produkce či distribuce cytokininů a dostupnosti dusíku v prostředí by mohly být IPT5 a IPT3. Při dlouhodobém podávání dusičnanů a amonných iontů byla pozorována závislost mezi podávanou dávkou a množstvím syntetizované IPT5, zatímco u rostlin majících omezený přístup k dusíku docházelo k akumulaci IPT3 po jednorázovém podání dusičnanů, nikoli však po

podání amonných kationtů [34].

## 2.4.2 Potenciální membránové přenašeče cytokininů

Jako možné specifické přenašeče cytokininů byly identifikovány proteiny z rodin PUP (z anglického „purine permease“), ENT (z anglického „equilibrative nucleoside transporter“) a z G podrodiny přenašečů ABC (z anglického „ATP-binding cassette“) [130]. Specifický přenos cytokininů přes biologickou membránu se stal předmětem studia různých výzkumných skupin teprve nedávno, a tudíž o něm doposud není mnoho známo, kromě identity a možných rolí těchto přenašečů, rozebraných podrobněji níže [131]. Existence specifických přenašečů cytokininů je předpokládána na základě rozdílné lokalizace proteinů významných pro jejich metabolismus a signalizaci; např. v zakládajících se postranních kořenech či apikálních meristémech byla pozorována odlišná distribuce enzymů IPT či LOG v porovnání s cytokininovými receptory [2,132–135].

Membránové přenašeče z rodiny PUP byly objeveny v souvislosti se schopností využívat adenin a cytosin jako zdroj dusíku. Jako první byl identifikován přenašeč AtPUP1, jehož vlastnosti byly dále zkoumány kompetitivními experimenty. Byla zjištěna inhibice importu adeninu za přítomnosti dalších dusíkatých bází (cytosinu a hypoxantinu), ale také sekundárních metabolitů kofeinu a nikotinu, pyridoxinu (jedné z forem vitamínu B6) nebo cytokininů [136–138]. Import adeninu přenašečem AtPUP1 také jevil závislost na pH a byl snížen při přidavku protonoforů či při inhibici  $H^+$ -ATPas. Tyto výsledky vedou k předpokladu, že substráty PUP jsou přenášeny symportem s protony [136,138,139].

Přenos tZ pomocí AtPUP1 byl také přímo studován akumulacími pokusy s radioaktivně značeným substrátem. Zvýšená exprese AtPUP1 dle očekávání korelovala s vyšší akumulací značeného tZ v buňkách. Transport tZ byl inhibován přítomností iPA nebo kinetinu. Afinita vůči cytokininům byla v téže studii pozorována i u přenašeče AtPUP2, avšak nikoli u přenašeče AtPUP3 [140]. Akumulační pokusy prováděné při různých koncentracích substrátu odhalily přítomnost nejméně dvou různých transportních systémů pro adenin a cytokininy lišících se svou afinitou [141].

Pro přenašeč AtPUP14 byla navržena specifická funkce při regulaci cytokininového signálu. Předpokládá se, že jeho role spočívá ve snižování koncentrace cytokininů na vnější straně cytoplasmatické membrány prostřednictvím jejich importu do buněk. Cytokininy tak nemohou interagovat se svými buněčnými receptory, neboť domény CHASE zodpovědné za vazbu ligandů se nacházejí v extracelulárním prostoru. Vysoká koncentrace AtPUP14 by tak měla být spojena se sníženou schopností přijímat cytokininový signál [130,142]. Tato hypotéza vznikla na základě

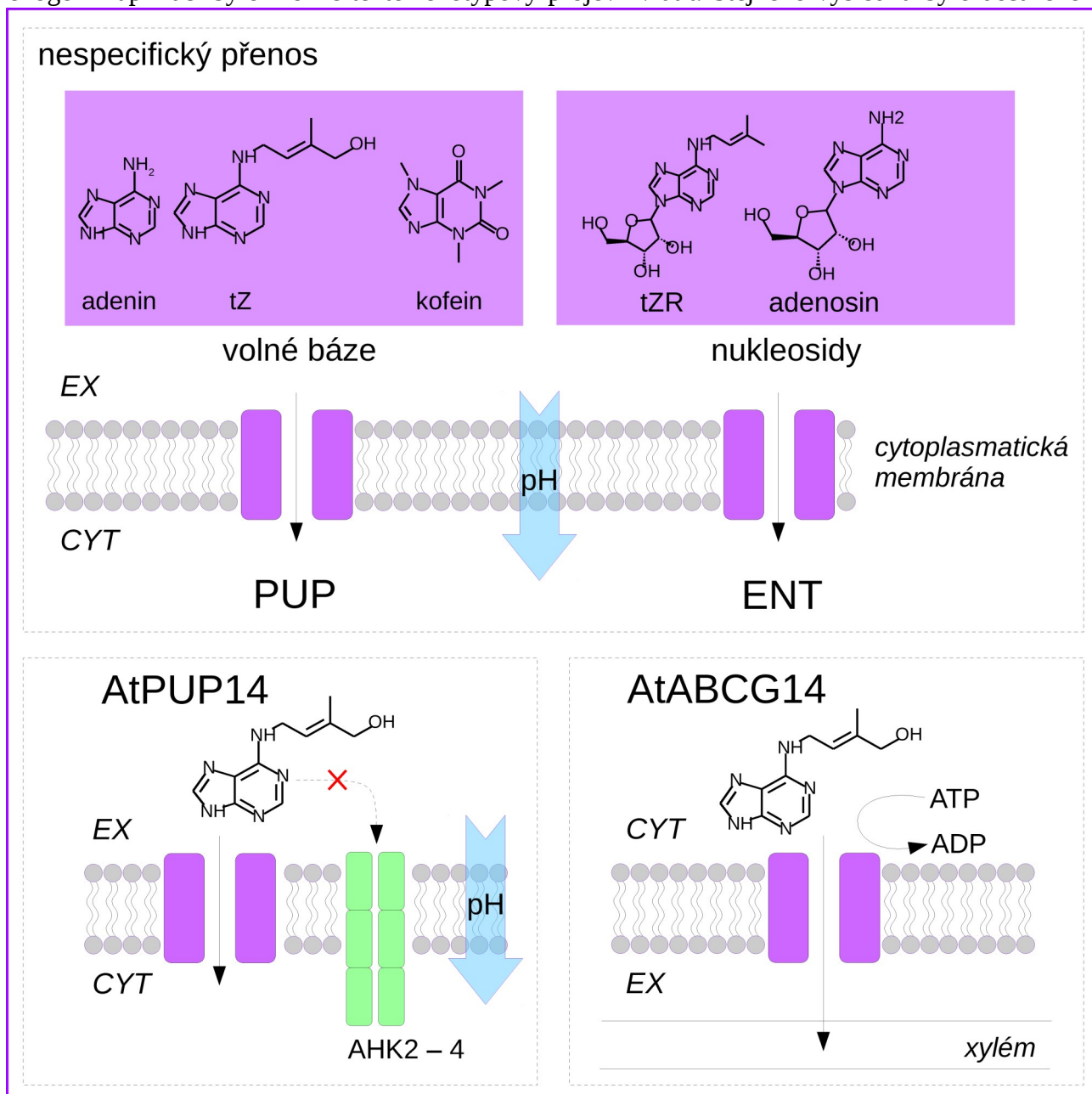
pozorování fluoreskujícího proteinového konstruktu TCSn::GFP, jehož exprese je spřažena s expresí genů kódujících regulátory B-ARR [135]. S jeho pomocí bylo zjištěno, že v zakládajících se děložních lístcích srdcovitého embrya *Arabidopsis* není přijímán cytokininový signál, a to navzdory přítomnosti receptoru AHK4. Bylo navrženo, že k útlumu signálu dochází prostřednictvím buněčného importu cytokininů specifickým přenašečem. AtPUP14 se zdál být velmi pravděpodobným kandidátem na tento přenašeč vzhledem k jeho vysoké expresi ve všech typech zkoumaných pletiv [141,142]. Tento předpoklad byl podpořen pozorovatelnými změnami jak v akumulaci TCSn::GFP, tak ve fenotypových projevech při snížení exprese AtPUP14 [142].

Přenašeče z rodiny ENT byly charakterizovány jako transmembránové proteiny podílející se na importu adenosinu [143]. Kompetitivní pokusy ukázaly, že kromě adenosinu mohou být těmito přenašeči transportovány také ostatní nukleosidy a 2'-deoxynukleosidy. Přídavek těchto látek vedl ke snížení akumulace adenosinu buňkami, zatímco přídavek nukleotidů (včetně jejich difosfátů, ATP či NAD<sup>+</sup>) či volných bází měl na import adenosinu jen malý vliv [144]. V souladu s těmito výsledky byly i pozorované afinity vůči cytokininům – přenašeče AtENT6 a AtENT8 pocházející z *Arabidopsis* a OsENT2 pocházející z rýže upřednostňovaly v několika provedených studiích ribosidové formy, a to zejména iPR, před volnými bázemi [93,145,146]. V této skupině však zatím nebyl nalezen žádný protein, který by bylo možno považovat za specifický cytokininový přenašeč tak jako AtPUP14.

Transmembránové proteiny homologické s rostlinnými ENT se vyskytují i u řady jiných eukaryot a uplatňují se především jako mediátory usnadněné difuze nukleosidů. Do této skupiny patří také lidské hENT, jejichž sekvence byla využita při identifikaci genu kódujícího AtENT1 v genomu *Arabidopsis* [139,143]. V rámci potenciálních cytokininových přenašečů se tím liší od PUP, které byly doposud nalezeny pouze v cévnatých rostlinách [130,137]. Rostlinné ENT se však zdají být v některých ohledech specifické. Na jejich aktivitu např. nemají vliv některé typické inhibitory jejich savčích homologů. Senzitivita některých rostlinných ENT vůči působení protonoforů a jejich relativně úzká pH optima zase napovídají, že by namísto usnadněné difuze mohly zprostředkovávat aktivní import, a to obdobně jako PUP mechanismem protonového symportu [139,145,147–149].

Konečně z podrodiny ABCG má pro výzkum transportu cytokininů v současnosti největší význam přenašeč AtABCG14. Jeho možná spojitost s cytokininy byla přibližně ve stejnou dobu objevena dvěma výzkumnými skupinami, z nichž jedna měla za cíl odhalit přenašeče uplatňující se při translokaci cytokininů vodivými pletivy [150], zatímco druhá se zabývala charakteristikou jednotlivých proteinů podrodiny ABCG [151]. Kořeny transgenních rostlin *Arabidopsis*

postrádajících AtABCG14 vykazovaly fenotypové projevy typické pro nadměrnou hladinu cytokininů a v porovnání s nemodifikovanými rostlinami byly méně citlivé vůči exogenní aplikaci tZ a BA. Nadzemní části se oproti tomu projevovaly jako při nedostatku cytokininů a jejich exogenní aplikací bylo možné tento fenotypový projev zvrátit. Stejného výsledku bylo dosaženo i



Obrázek 5: Navržené membránové přenašeče cytokininů. Afinita vůči cytokininům byla pozorována u řady přenašečů z rodiny PUP či ENT, které však kromě cytokininů přenášejí i další látky (nahore). Přenašeče z rodiny PUP vykazují afinitu zejména vůči adeninu a jeho derivátům ve formě volných bází, přenašeče z rodiny ENT zase vůči nukleosidům. Oba tyto typy přenašečů zajišťují transport z extracelulárního prostoru (EX) do cytoplasmy (CYT) mechanismem protonového symportu. Jakožto potenciální specifické cytokininové přenašeče jsou v současné době zkoumány proteiny AtPUP14 (vlevo dole) a AtABCG14 (vpravo dole). Buněčný import cytokininů prostřednictvím AtPUP14 by mohl být jedním z mechanismů regulace cytokininové signální dráhy, neboť odčerpávání cytokininů z extracelulárního prostoru snižuje jejich dostupnost pro receptory (AHK2 – 4). AtABCG14 zajišťuje primární transport spážený s hydrolyzou ATP a zřejmě se podílí na exportu tZ z kořenových buněk do xylému. Sestaveno podle [40,130].

při naroubování transgenního prýtu na divoké kořeny, zatímco opačně naroubovaný konstrukt si fenotyp poukazující na změny v koncentraci cytokininů zachoval. Pozorovaná zvýšená akumulace cytokininů, především tZ, v kořenech transgenních rostlin byla zřejmě následkem oslabení translokace těchto látek vodivými pletivy. Tomu nasvědčoval i výrazný pokles koncentrace cytokininů v xylému a v nadzemních částech transgenních rostlin. Na základě výsledků dvou výše zmíněných studií bylo navrženo, že ABCG14 se uplatňuje jako exportér tZ z kořenů do xylému [130,131,150,151].

Za zmínku stojí, že proteiny z podrodiny ABCG jsou mezi vyššími rostlinami obzvláště rozšířené a řada z nich je zapojena do transportu jiných skupin fytohormonů, jakými jsou auxiny, strigolaktony nebo kyselina abscisová [152–154]. Není tedy vyloučeno, že se v budoucnu objeví jejich další možná propojení s cytokininy a distribucí jejich signálu.

### 3 Cíle práce

Cílem práce bylo přispět k objasnění mechanismu přenosu cytokininů přes plasmatickou membránu prostřednictvím přenašečů AtABCG14 a AtPUP14. Byly proto vytyčeny následující dílčí cíle:

1. Zjistit, zdali se zvýšená exprese přenašeče AtABCG14 nebo AtPUP14 projeví na změně akumulace cytokininů v buňkách BY-2.
2. Charakterizovat substrátovou specifitu těchto přenašečů.
3. Určit, zdali se zvýšená exprese některého z těchto přenašečů projeví na metabolických dějích, jimž cytokininy v buňkách BY-2 podléhají.



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

Pracovalo se s buněčnými kulturami BY-2 tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) [155,156]. Z této kultury byly odvozené transgenní linie vykazující zvýšenou expresi přenašečů AtABCG14 a AtPUP14 po indukci estradiolem (EST) rozpuštěném v dimethylsulfoxidu (DMSO). Exprese AtABCG14 byla spřažena s expresí fluorescenční sondy mCherry [157]. Jako kontrola byly využívány suspenze transformovaných buněčných linií bez přídavku estradiolu. Buněčné suspenze byly poskytnuty Laboratoří hormonálních regulací u rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

#### 4.1.2 Chemikálie

##### 4.1.2.1 Radioaktivně značené cytokininy

Pracovalo se s cytokininy značenými radioaktivním nuklidem  $^3\text{H}$ . Značené cytokininy byly připraveny v Izotopové laboratoři Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. a byly uchovávány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jejich důležité vlastnosti jsou shrnuty v *Tabulce 1*.

*Tabulka 1: Radioaktivně značené cytokininy, jejich specifická radioaktivita a koncentrace.*

<i>látk</i>	<i>specifická radioaktivita /</i> (Ci·mmol <sup>-1</sup> )	<i>označení zásobního</i> <i>roztoku</i>	<i>koncentrace /</i> (μmol·l <sup>-1</sup> )
$^3\text{H}$ -tZ	32,0	P8	3,84
		P9	3,77
$^3\text{H}$ -tZR	32,0	P8	2,78
$^3\text{H}$ -iP	26,0	P7	10,10
		P8	9,75
$^3\text{H}$ -iPR	37,5	P7	7,36
		P8	7,40

##### 4.1.2.2 Další chemikálie

Izolace celkové rostlinné RNA (viz 4.2.2.1) byla prováděna pomocí komerční sady Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA) obsahující 2-merkaptoethanol, lyzační roztok, filtrační kolonky, vázající roztok, izolační kolonky, promývací roztok 1, promývací roztok 2 a eluční roztok.

Odstranění kontaminující DNA (viz 4.2.2.2) bylo prováděno pomocí komerční sady Invitrogen DNA-free DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) obsahující 10krát koncentrovaný DNAsový pufr (100mM Tris-HCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH = 7,5),

inaktivátor DNasy a vodu bez obsahu nukleas.

Při reverzní transkripci (viz 4.2.2.3) a kvantitativní RT-PCR (viz 4.2.2.4) byly využívány následující produkty od společnosti Promega Corporation (USA) - pufr reverzní transkriptasy, reverzní transkriptasa, směs deoxyribonukleosidtrifosfátů, primer Oligo(dT), inhibitor RNas RNasin Plus a směs GoTaq pro kvantitativní PCR.

### **4.1.3 Přístrojové vybavení**

#### **Mikroskopické techniky**

fluorescenční mikroskop Eclipse E600 (Nikon, Japonsko)

inverzní mikroskop Axiovert 40 C (Carl Zeiss, Německo)

#### **Kvantitativní RT-PCR**

termocyklér TProfessional (Analytik Jena, Německo)

PCR systém LightCycler 480 (Roche, Německo)

stolní centrifuga Combi-Spin FVL-2400N (Biosan, Lotyšsko)

stolní centrifuga Minispin (Eppendorf, Německo)

#### **Akumulační experimenty**

rotační olejová vývěva VR 1,5/12 (Lavet, Česká republika)

stolní třepačka KS 130 (IKA, USA)

scintilační počítač Tri-Carb 4910 TR (PerkinElmer, USA)

#### **Extrakce, purifikace a analýza cytokininové frakce**

homogenizační mlýnek MM 301 (Retsch, Německo)

rotační vakuová odparka Alpha RVC (Christ, Německo)

vakuový manifold Visiprep 24 (Supelco, USA)

extrakční kolonky Oasis MCX 1cc (Waters, USA)

HPLC kolona Kinetex C18 (Phenomenex, USA)

HPLC průtokový detektor Ramona 2000 (Raytest, Německo)

#### **Další používané přístroje**

centrifuga 5430 R (Eppendorf, Německo)

hlubokomrazicí skříňový box MDF-U700VX (Panasonic, Japonsko)

orbitální třepačka IS-971R, 30 mm orbit (Jeio Tech, Jižní Korea)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Mikroskopické techniky

#### 4.2.1.1 Stanovení hustoty buněčné suspenze

Pro stanovení hustoty buněčné suspenze byl využit inverzní mikroskop Axiovert 40 C. Preparát byl připraven z malého množství suspenze odebraného během akumulčních experimentů (viz 4.2.3.1). Počítání buněk bylo prováděno ve Fuchsově-Rosenthalově komůrce o hloubce 0,200 mm, rozdělené na políčka o ploše 0,0625 mm<sup>2</sup>. Počítání buněk v odebrané alikvótě buněčné suspenze bylo prováděno v triplikátech.

#### 4.2.2.1 Ověření lokalizace proteinu AtABCG14

Pro ověření exprese a lokalizace konstruktů AtABCG14::mCherry produktu byl využit fluorescenční mikroskop Eclipse E600 (Nikon). Preparát připravený z malého množství indukované buněčné suspenze byl pozorován při ozáření fluorescenční lampou. Lokalizace AtABCG14::mCherry byla na základě obrazu vyhodnocována subjektivně.

### 4.2.2 Ověření exprese přenašečů AtABCG14 a AtPUP14 kvantitativní RT-PCR

#### 4.2.2.1 Izolace RNA

Buňky odebrané během akumulčních experimentů (viz 4.2.3.1) byly homogenizovány v mlýnku MM 301 (Retsch) po dobu 4 minut při rychlosti 3 000 RPM. K homogenizovanému materiálu bylo přidáno 500 µl směsi 2-merkптоethanolu a lyzačního roztoku připravené v poměru 1:100. Po promíchání následovala inkubace po dobu 3 – 5 min při teplotě 56 °C a dále 3minutová centrifugace na stolní centrifuze Minispin při přetížení 13 148 × *g* (14 000 RPM).

400 µl supernatantu bylo převedeno na filtrační kolonku. Po minutové centrifugaci při přetížení 13 148×*g* bylo k filtrátu přidáno 400 µl vázajícího roztoku. Tato směs byla aplikována na izolační kolonku. Po minutové centrifugaci při přetížení 13 148 × *g* byl odstraněn supernatant a izolační kolonka byla promyta dvakrát promývacím roztokem 1 a jednou promývacím roztokem 2 (v tomto pořadí), vždy po 500µl. Po každé aplikaci promývacího roztoku následovala minutová centrifugace při přetížení 13 148 × *g* a odstranění supernatantu. Po posledním promytí byla centrifugace za stejných podmínek opakována bez přídavku promývacího roztoku.

Dále bylo na izolační kolonku aplikováno 50 µl elučního roztoku. Po minutové inkubaci při laboratorní teplotě bylo opakováno minutové stočení při přetížení 13 148 × *g*. Výsledný eluát obsahoval celkovou izolovanou RNA.

#### 4.2.2.2 Odstranění kontaminující DNA ze vzorků RNA

K 50  $\mu$ l celkové izolované RNA byl přidán 1  $\mu$ l DNasy a 5  $\mu$ l DNasového pufru. Následovala 30minutová inkubace při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 5  $\mu$ l důkladně promíchaného inaktivátoru DNasy. Následovalo dvouminutové stočení na stolní centrifuze Minispin při přetížení  $8\,117 \times g$  (11 000 RPM) a odebrání supernatantu.

#### 4.2.2.3 Reverzní transkripce

K 5  $\mu$ l RNA ošetřené Dnasou byl přidán 1  $\mu$ l primeru Oligo(dT) a 8  $\mu$ l vody bez obsahu nukleas. Směs byla krátce stočena na stolní centrifuze Combi-Spin FVL-2400N, pět minut inkubována při teplotě 70 °C a hned poté zchlazena na ledu. Dále bylo přidáno 5  $\mu$ l pufru reverzní transkriptasy; 1,25  $\mu$ l směsi deoxyribonukleotidů; 0,5  $\mu$ l reverzní transkriptasy; 0,5  $\mu$ l RNasového inhibitoru RNAsin PLUS a 3,75  $\mu$ l vody bez obsahu nukleas. Reverzní transkripce probíhala při teplotě 42 °C po dobu jedné hodiny. 5  $\mu$ l výsledné směsi bylo 20krát naředěno vodou bez obsahu nukleas.

#### 4.2.2.4 Kvantitativní PCR

K 2,5  $\mu$ l naředěné cDNA bylo přidáno 0,5  $\mu$ l směsi primerů pro AtABCG14 nebo AtPUP14; 5  $\mu$ l komerční směsi qPCR Master Mix (od firmy Promega Corporation) a 1,5  $\mu$ l vody bez obsahu nukleas. Obdobně byla připravena kontrolní reakční směs obsahující primery pro elongační faktor NtEF1a. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v *Tabulce 2*.

*Tabulka 2: Sekvence primerů použitých při kvantitativní RT-PCR.*

NtEF1a	TGAGATGCACCACGAAGCTC CCAACATTGTCACCAGGAAGTG
AtABCG14	TCGGTGCTCTGCTTATGAAC ACGATGAAGGGAGGAATTTG
AtPUP14	GGATTCTCGAAAGGGAAAGG GACAACACGCTCGAAACAGA

Po pětiminutové centrifugaci na centrifuze 5430 R (Eppendorf) při přetížení  $2038 \times g$  (4 500 RPM) byly reakční směsi vloženy do přístroje Light Cycler 480 a byla zahájena PCR, jejíž průběh je znázorněn v *Tabulce 3* (strana 29). Během PCR byla průběžně měřena fluorescence reakční směsi. PCR jednotlivých reakčních směsí byly prováděny v duplikátech.

Naměřené hodnoty fluorescence v průběhu jednotlivých reakcí byly vyneseny vůči počtu uskutečněných amplifikačních cyklů. Z takto sestavené fluorescenční křivky byl odečten bod CP (z anglického „crossing point“) jako počet amplifikačních cyklů, při němž fluorescenční křivka dosáhla maxima své druhé derivace. Relativní zvýšení exprese daného genu po indukci estradiolem,

FC, bylo vypočítáno podle vztahu

$$FC = \frac{2^{CP_G(DMSO)} \cdot 1,8^{CP_E(EST)}}{2^{CP_G(EST)} \cdot 1,8^{CP_E(DMSO)}} \quad (1)$$

ve kterém  $CP_G$  značí hodnotu CP pro AtABCG14 nebo AtPUP14 a  $CP_E$  značí hodnotu CP pro NtEF1a; hodnoty CP dosažené v neindukovaných buňkách jsou označeny jako (DMSO), v indukovaných buňkách jako (EST). Ze dvou paralelně stanovených hodnot FC byl určen aritmetický průměr.

Tabulka 3: Přehled kroků PCR při ověřování exprese přenašečů AtABCG14 a AtPUP14.

<i>krok PCR</i>	<i>počet provedení</i>	<i>inkubační teplota / °C</i>	<i>inkubační doba / s</i>
preinkubace	1	95	120
vlastní amplifikace	45	95	10
		58	15
		72	20
		95	5
analýza křivky tání	1	65	60
<i>postupné ohřívání na 90 °C</i>			

## 4.2.3 Akumulační experimenty

### 4.2.3.1 Příprava buněčné suspenze

Buňky z dvoudenní suspenze byly převedeny do 200 ml příjmového pufru (10 mM sacharosa; 0,5 mM  $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 20 mM kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová; pH = 5,7). Malé množství buněčného materiálu (nanejvýš 100 mg) bylo odebráno pro kvantitativní RT-PCR (viz 4.2.2). Nově vzniklé suspenze byly 45 minut inkubovány na třepačce Jeio Tech IS-971R při teplotě 27 °C a rychlosti třepání 150 RPM.

Po inkubaci byly buňky převedeny do 100 ml příjmového pufru. Ze vzniklé suspenze byl odebrán 1 ml pro stanovení buněčné hustoty (viz 4.2.1). Suspenze byly inkubovány za výše uvedených podmínek alespoň po dobu 90 minut.

### 4.2.3.2 Akumulace značených cytokininů v buňkách BY-2

Akumulační experiment byl zahájen přidavkem radioaktivně značeného cytokininu do 10 ml připravené buněčné suspenze. Značené cytokininy byly přidávány v takovém množství, aby jejich celková koncentrace v buněčné suspenzi činila  $2 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Ihned po přidavku značeného cytokininu bylo 0,5 ml buněčné suspenze filtrováno přes filtrační papír. Zadržovaný buněčný materiál byl i s filtračním papírem přenesen do prázdné plastové scintilační viálky. Tímto způsobem bylo provedeno celkem deset odběrů v přibližně patnáctiminutovém časovém rozmezí. V případě kompetitivního experimentu byl k buněčné suspenzi přidán nadbytek kompetující sloučeniny okolo šesté minuty po zahájení akumulčního experimentu.

Po ukončení vlastní akumulace bylo do všech scintilačních viálek přidáno po 0,5 ml 96% ethanolu a po 30minutové inkubaci při laboratorní teplotě po 4 ml scintilačního koktejlu EcoLite (MP Biomedicals, USA). Scintilační viálky byly uzavřeny a spolu se slepými vzorky vyrovnány do plastových kazet určených pro scintilační počítač Tri-Carb 4910 TR. Po 20minutovém třepání na stolní třepačce KS 130 rychlostí 400 RPM byly kazety vloženy do scintilačního počítače TriCarb 4910 TR. Pomocí softwaru QuantaSmart (PerkinElmer, USA) byla stanovena radioaktivita v jednotlivých viálkách.

#### **4.2.4 Sledování metabolických přeměn cytokininů**

##### **4.2.4.1 Příprava buněčných suspenzí s radioaktivně značenými cytokininy**

K 6 ml buněčné suspenze byl přidán radioaktivně značený cytokinin v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace v buněčné suspenzi činila  $20 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Ihned po přidavku značeného cytokininu byly odebrány 3 ml suspenze, z níž byla odfiltrována veškerá kapalná fáze. Zadržené buňky byly převedeny do čisté mikrozskumavky a zamrazeny pomocí tekutého dusíku. Stejný postup byl opakován po uplynutí přibližně patnácti minut se zbylými 3 ml buněčné suspenze.

##### **4.2.4.2 Extrakce a purifikace cytokininové frakce**

Postup pro získání čisté cytokininové frakce byl odvozen z metody vyvinuté na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. sloužící k separaci fytohormonů z biologického materiálu [158]. Ke vzorkům odebraným během předchozího kroku bylo přidáno po 300  $\mu\text{l}$  Bielekého činidla (750 ml 100% methanolu a 50 ml 99% kyseliny mravenčí, doplněno destilovanou vodou do 1 l). Vzorky byly homogenizovány v mlýnku MM 301 (Retsch) po dobu 4 minut při frekvenci 30 Hz. Homogenizované vzorky byly následně 10 minut centrifugovány na centrifuze 5430 R (Eppendorf) při přetížení  $28\,433 \times g$  (17 000 RPM). Supernatant byl na rotační vakuové odparce Alpha RVC zahuštěn na celkový objem 0,2 ml.

Extrakční kolonky Oasis MCX 1cc byly nasazeny na vakuový manifold Visiprep 24 a aktivovány postupným promytím 1 ml methanolu a 1 ml 1 M kyseliny mravenčí. Odparky získané předchozím zpracováním vzorků byly rozpuštěny v 500  $\mu\text{l}$  1 M kyseliny mravenčí a aplikovány na aktivované kolonky.

Pro eluci nežádoucích frakcí byly extrakční kolonky postupně promyty 1 ml 1 M kyseliny mravenčí, 500  $\mu\text{l}$  destilované vody, a dvakrát 250  $\mu\text{l}$  methanolu. Následovala eluce cytokininové frakce dvakrát opakovaným promytím extrakčních kolonek 250  $\mu\text{l}$  roztoku B (0,35 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  v 60% methanolu). Izolované frakce byly předány na analýzu pomocí HPLC.

## 5 Výsledky

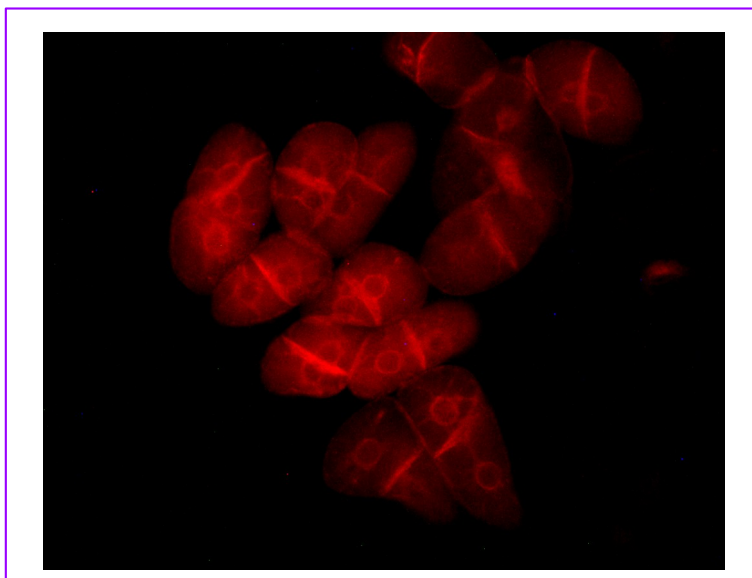
### 5.1 Exprese AtABCG14 a AtPUP14

Zvýšená exprese přenašečů AtABCG14 a AtPUP14 při indukci estradiolem byla ověřena pomocí kvantitativní RT-PCR. V *Tabulce 3* jsou shrnuty stanovené hodnoty CP a relativního zvýšení exprese genu pro daný přenašeč při indukci buněk estradiolem. Pokaždé došlo ke zvýšení exprese o minimálně jeden řád, čímž bylo potvrzeno zvýšení exprese daného přenašeče v indukovaných buňkách.

*Tabulka 3: Parametry kvantitativní RT-PCR. Hodnoty CP stanovené na základě naměřené fluorescence byly použity k výpočtu relativního zvýšení exprese přenašeče AtABCG14 nebo AtPUP14 podle vztahu (1). Uvedené výsledky jsou aritmetické průměry dvou paralelních měření. DMSO značí neindukované buňky, EST indukované buňky.*

	gen	NtEF1a		AtABCG14		relativní zvýšení exprese
		1	2	1	2	
11. 12. 2017	provedení					
	CP (DMSO)	22,65	22,11	30,65	30,04	<b>394</b>
	CP (EST)	24,35	23,77	23,14	23,2	
2. 2. 2018	gen	NtEF1a		AtPUP14		relativní zvýšení exprese
		1	2	1	2	
2. 2. 2018	provedení					
	CP (DMSO)	18,71	18,71	30,11	29,94	<b>71</b>
	CP (EST)	18,63	18,73	23,88	23,81	
9. 2. 2018	gen	NtEF1a		AtPUP14		relativní zvýšení exprese
		1	2	1	2	
9. 2. 2018	provedení					
	CP (DMSO)	17,08	17,2	31,75	31,85	<b>327</b>
	CP (EST)	18,54	18,53	24,76	24,51	
16. 2. 2018	gen	NtEF1a		AtPUP14		relativní zvýšení exprese
		1	2	1	2	
16. 2. 2018	provedení					
	CP (DMSO)	22,85	22,98	34,37	35,87	<b>78</b>
	CP (EST)	22,47	22,68	27,93	28,95	

Lokalizace přenašeče AtABCG14, jehož exprese byla spřažena s expresí fluorescenční sondy mCherry, byla ověřena pozorováním indukovaných buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Byla potvrzena relativně vysoká koncentrace přenašeče AtABCG14 na cytoplasmatické membráně v porovnání s ostatními kompartmenty (viz *Obrázek 6*, strana 32).



*Obrázek 6: Lokalizace proteinu AtABCG14 značeného červenou fluorescenční sondou mCherry. Nejvyšší lokalizace (odpovídající nejintenzivnější fluorescenci) byla zaznamenána na cytoplasmatických membránách, což je dobře vidět na přepážkách mezi sousedními buňkami. Snímek byl pořízen při pozorování fluorescenčním mikroskopem Axiovert 40C (200násobné zvětšení) a graficky upraven.*

## 5.2 Akumulační pokusy

Vliv zvýšené exprese přenašečů AtABCG14 a AtPUP14 na membránový transport cytokininů byl sledován s využitím akumulace radioaktivně značených cytokininů v indukovaných a neindukovaných buňkách BY-2. Naměřené hodnoty radioaktivity v buňkách byly vyneseny vůči času odběru příslušných vzorků, čímž vznikly akumulační křivky vyjadřující časový průběh akumulace daného cytokininu. Při vyhodnocování těchto křivek byl sledován zejména jejich průběh a rozdíl mezi polohami křivek představujících akumulaci v indukovaných a neindukovaných buňkách.

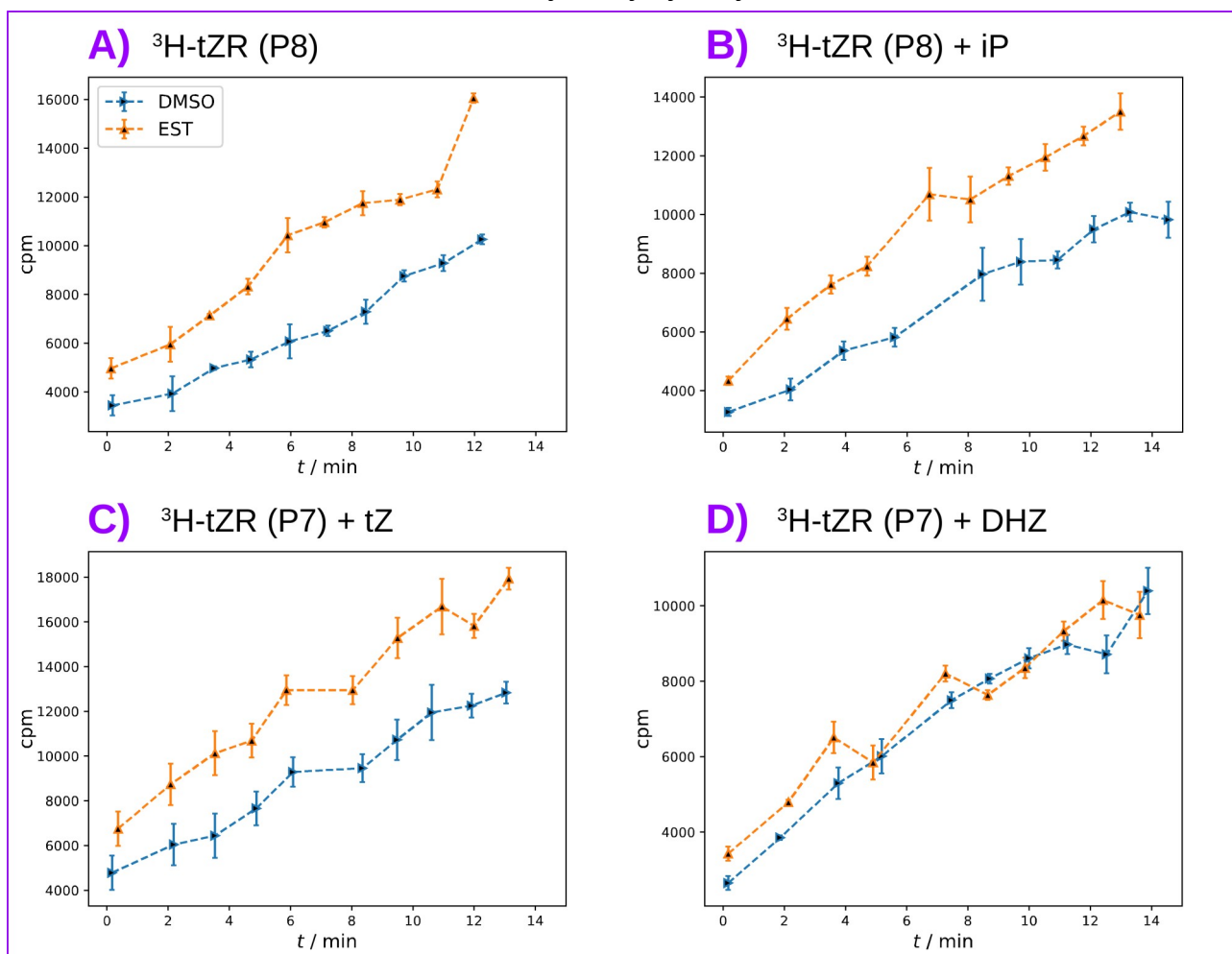
Zvýšená exprese přenašeče AtABCG14 se na akumulaci značených cytokininů prakticky neprojevila. Naměřené hodnoty radioaktivity v indukovaných i neindukovaných buňkách si byly v řadě případů blízké a případné rozdíly byly nekonzistentní (výsledky těchto experimentů zde nejsou uvedeny).

Zvýšená exprese přenašeče AtPUP14 vedla ve většině případů ke zvýšení akumulace dané látky, na tvar akumulační křivky však vliv neměla (viz *Obrázek 7A*, strana 33 a *Obrázek 9A*, strana 35). Relativní zvýšení akumulace bylo zjištěno u všech použitých značených cytokininů.

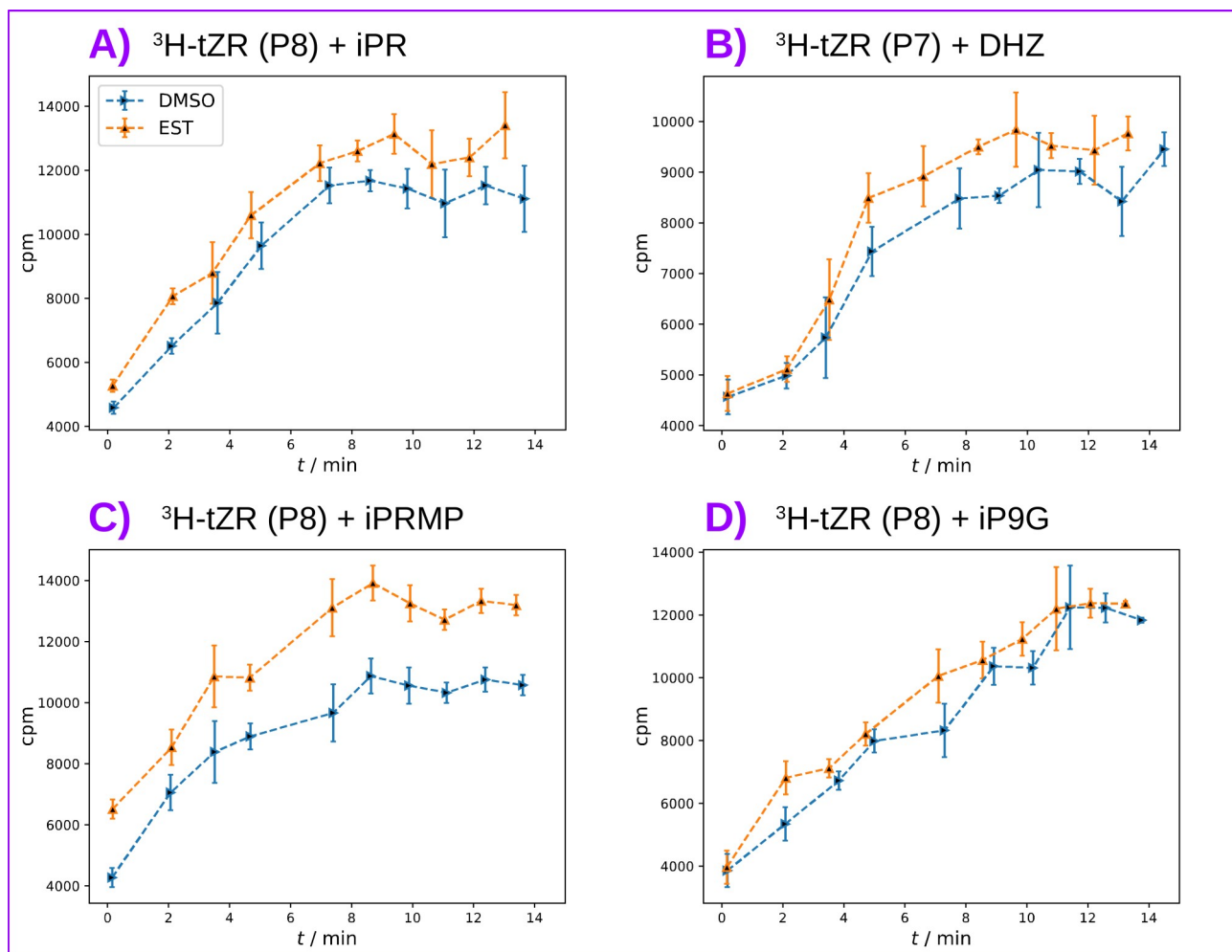
Substrátová specifita přenašeče AtPUP14 byla dále studována pomocí kompetitivních experimentů spočívajících v přidavku neznačeného cytokininu. Případná kompetice se projevila náhlým poklesem směrnice akumulační křivky. Při přidavku neznačeného cytokininu ve formě



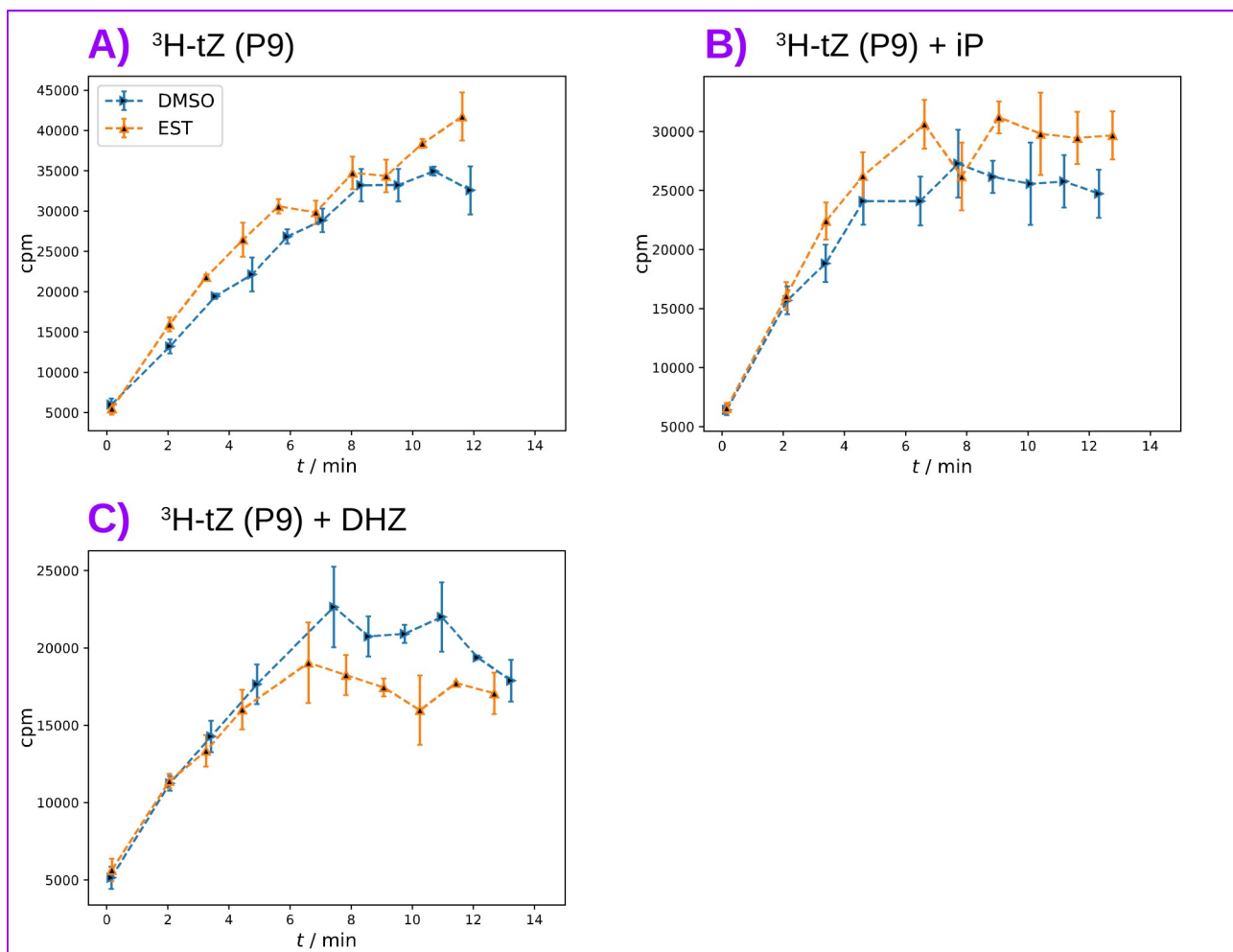
volné báze k  $^3\text{H}$ -tZR ke kompetici nedocházelo (viz *Obrázek 7B – D*, strana 33), zatímco přídavek neznačeného ribosidu akumulaci  $^3\text{H}$ -tZR do jisté míry inhiboval (viz *Obrázek 8A, B*, strana 34). K obdobné kompetici docházelo také při přidavku neznačené volné báze ke značenému  $^3\text{H}$ -tZ (viz *Obrázek 9B, C*, strana 35). Dále byla zjištěna i inhibice akumulace  $^3\text{H}$ -tZR při přidavku neznačeného tZRMP (viz *Obrázek 8C*, strana 34). Přídavek neznačeného iP9G se na akumulaci  $^3\text{H}$ -tZR neprojevil (viz *Obrázek 8D*, strana 34). Chemická identita postranních řetězců kompetujících sloučenin neměla na akumulaci značené látky žádný výrazný vliv.



*Obrázek 7: Akumulační křivky charakterizující časový průběh importu radioaktivně značených cytokininů neindukovanými (DMSO) a indukovanými buňkami (EST) tabákové kultury BY-2. Míra akumulace je vyjádřena zaznamenanou radiaktivitou vyjádřenou v počtu přeměn za minutu (cpm). Graf (A) znázorňuje akumulaci  $^3\text{H}$ -tZR bez přidavku kompetujících sloučenin. Na následujících grafech (B - D) jsou křivky odpovídající akumulaci  $^3\text{H}$ -tZR při přidavku neznačeného cytokininu ve formě volné báze okolo šesté minuty. Označení v závorkách odpovídají označením zásobních roztoků radioaktivně značených cytokininů uvedeným v Tabulce 1. Experimentální body představují medián ze tří paralelně stanovených hodnot.*



Obrázek 8: Akumulační křivky charakterizující časový průběh importu radioaktivně značených cytokininů neindukovanými (DMSO) a indukovanými buňkami (EST) tabákové kultury BY-2. Míra akumulace je vyjádřena zaznamenanou radiaktivitou vyjádřenou v počtu přeměn za minutu (cpm). Na grafech je znázorněn průběh akumulace  $^3\text{H}$ -tZR při přidavku neznačeného cytokininu ve formě ribosidu (A, B), ribosidmonofosfátu (C) a glukosidu (D). Označení v závorkách odpovídají označením zásobních roztoků radioaktivně značených cytokininů uvedeným v Tabulce 1. Experimentální body představují medián ze tří paralelně stanovených hodnot.

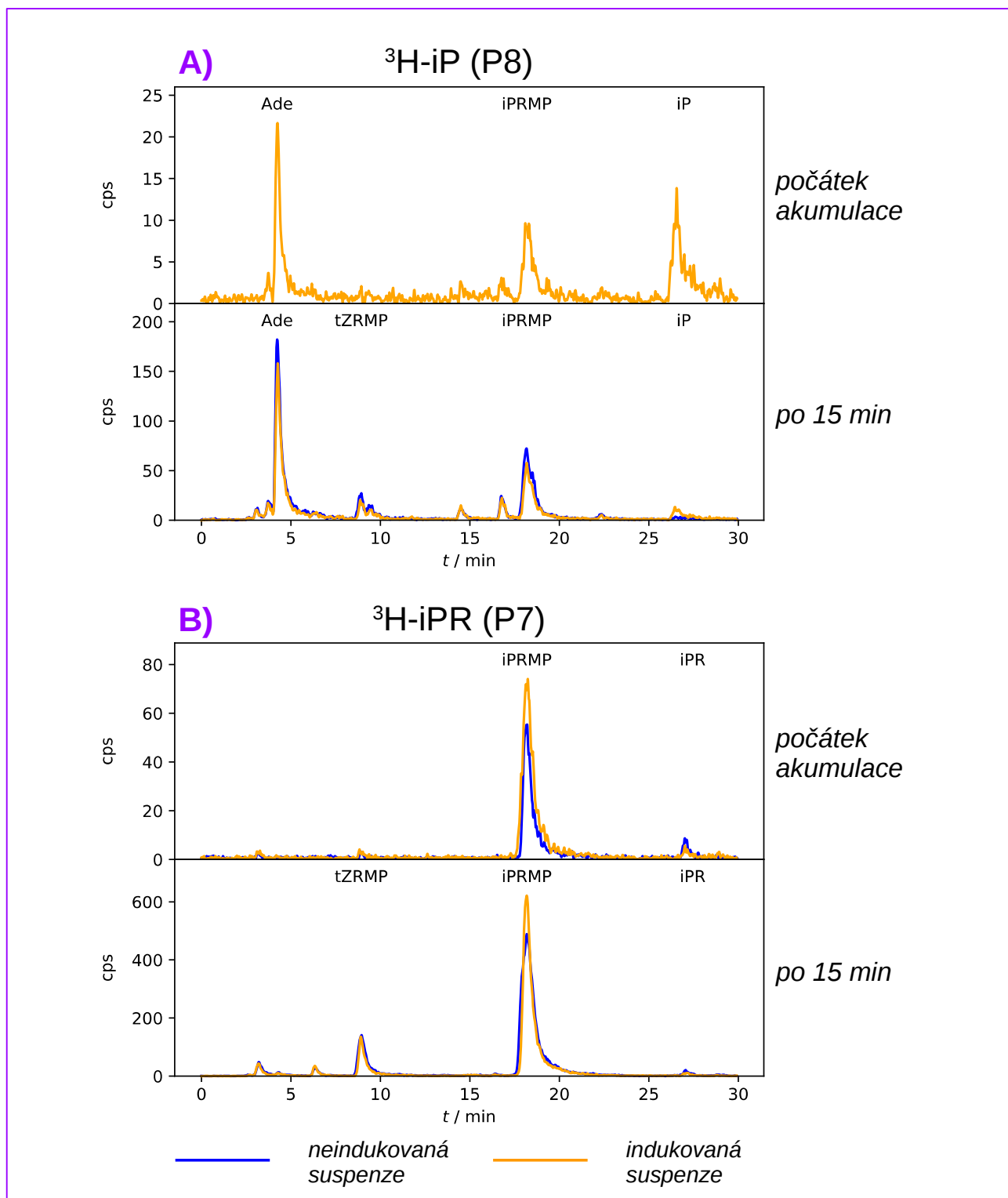


Obrázek 9: Akumulační křivky charakterizující časový průběh importu radioaktivně značených cytokininů neindukovanými (DMSO) a indukovanými buňkami (EST) tabákové kultury BY-2. Míra akumulace je vyjádřena zaznamenanou radiaktivitou vyjádřenou v počtu přeměn za minutu (cpm). Graf (A) znázorňuje akumulaci  $^3\text{H-tZ}$  bez přídavku kompetující sloučeniny, grafy (B, C) akumulaci též látky při přídavku nenzačeného cytokininu ve formě volné báze. Označení v závorkách odpovídají označením zásobních roztoků radioaktivně značených cytokininů uvedeným v Tabulce 1. Experimentální body představují medián ze tří paralelně stanovených hodnot.

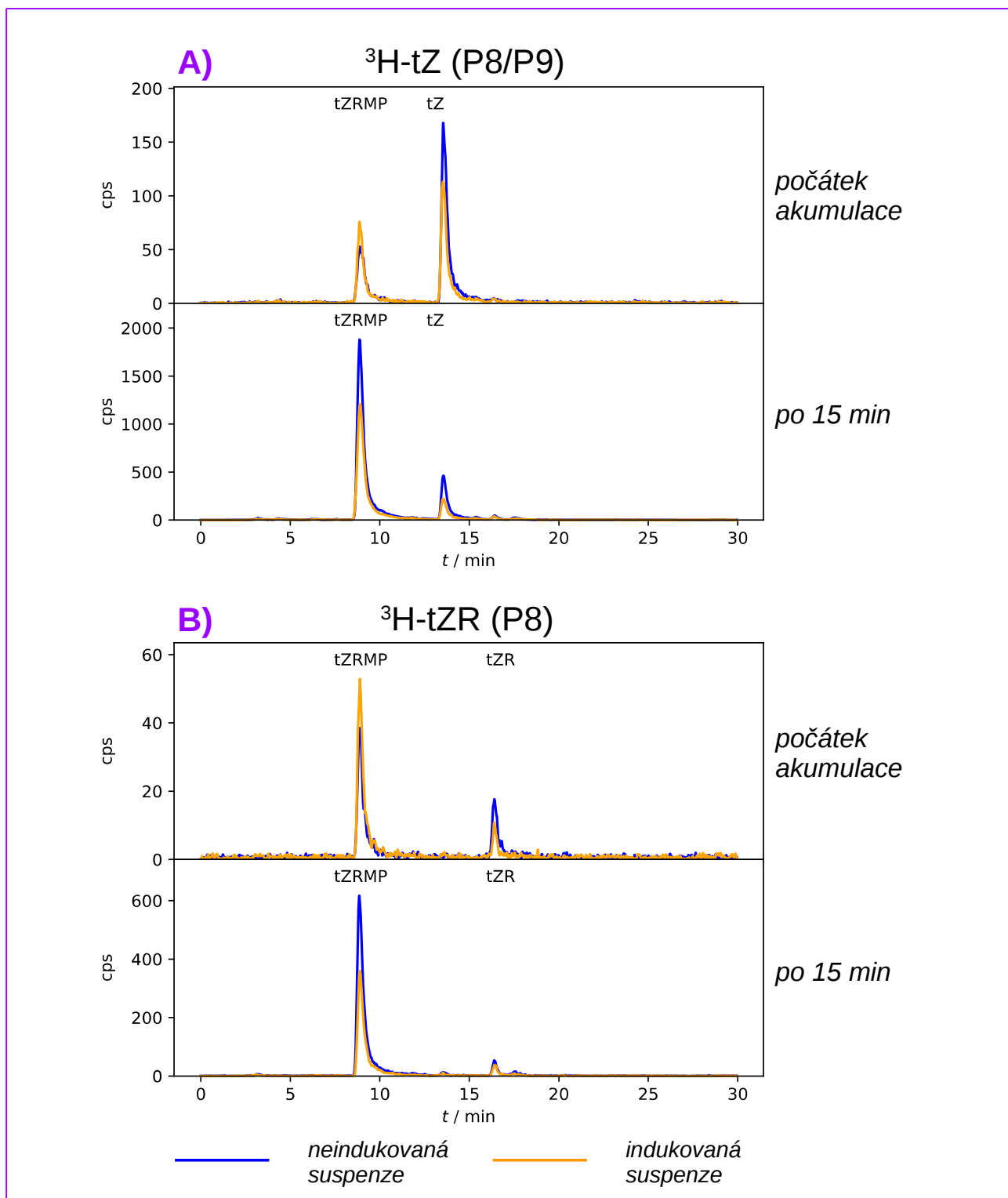
### 5.3 Metabolismus značených cytokininů během akumulace

Pro ověření vlivu exprese přenašeče AtPUP14 na metabolismus akumulovaných cytokininů byla z buněk izolována cytokininová frakce, jejíž obsah byl dále studován pomocí HPLC. Izolace cytokininové frakce byla provedena na začátku akumulace a po uplynutí patnácti minut. Signály zaznamenané na výsledných chromatogramech (viz *Obrázky 10 a 11*, strany 37 a 38; zveřejněno s laskavým svolením Ing. Petre I. Dobрева, CSc.) byly identifikovány porovnáním s dostupnými standardy retenčních časů. Z chromatogramů je patrné, že indukce buněčné suspenze nevedla ke vzniku odlišných metabolitů ani k významné změně poměrů vznikajících metabolitů, v porovnání s neindukovanými buňkami.

Metabolické přeměny  $^3\text{H}$ -iP (viz *Obrázek 10A*, strana 37) započaly ihned po jeho přidavku do buněčné suspenze. Jako jeho metabolity vznikaly adenin, iPRMP a později také tZRMP. Je zajímavé, že v případě  $^3\text{H}$ -iPR (viz *Obrázek 10B*, strana 37) ke konverzi na adenin nedocházelo.  $^3\text{H}$ -tZ (viz *Obrázek 11A*, strana 38) i  $^3\text{H}$ -tZR (viz *Obrázek 11B*, strana 38) byly metabolizovány za vzniku tZRMP.



Obrázek 10: Analýza metabolitů  $^3\text{H}$ -iP (A) a  $^3\text{H}$ -iPR (B) v buňkách BY-2 pomocí HPLC. Odpověď detektoru je vyjádřena počtem přeměn za sekundu (cps). Jednotlivé signály byly identifikovány na základě porovnání s dostupnými standardy. V případě  $^3\text{H}$ -iP (A) se nepodařilo zaznamenat chromatogram odpovídající neindukovaných buňkám. Označení v závorkách odpovídají označením zásobních roztoků radioaktivně značených cytokininů uvedeným v Tabulce 1.



Obrázek 11: Analýza metabolitů  $^3\text{H}$ -tZ (A) a  $^3\text{H}$ -tZR (B) v buňkách BY-2 pomocí HPLC. Odpověď detektoru je vyjádřena počtem přeměn za sekundu (cps). Jednotlivé signály byly identifikovány na základě porovnání s dostupnými standardy. Označení v závorkách odpovídají označením zásobních roztoků radioaktivně značených cytokininů uvedeným v Tabulce 1.

## 6 Diskuse

Cytokinin, ač původně objeveny v souvislosti se stimulací buněčné proliferace, se během posledních desetiletí ukázaly být důležitou skupinou signálních sloučenin, která se podílí na řízení celé řady fyziologických procesů a hraje zásadní roli během celého rostlinného životního cyklu. Komplexní vývoj jejich metabolismu i signální dráhy napříč rostlinnou říší, jakožto i přítomnost podobných sloučenin v jiných než rostlinných organismech dále otevírají otázku jejich možného podílu např. na evoluci vztahů mezi rostlinami a jejich okolím [35].

Svou rozmanitostí, z hlediska fyzikálně chemických i biologických vlastností, se tak právem řadí po bok auxinů, s nimiž je pojí synergické i antagonistické spolupůsobení v mnohých fyziologických procesech [2]. Při takto komplexním spektru účinků lze očekávat existenci složitého regulačního mechanismu, který by mohl umožnit modulaci působení daných fytohormonů v závislosti na typu a stádiu pletiva nebo přítomnosti jiných signálních podnětů, endogenních i exogenních. Zatímco v případě auxinů je tato modulace spojována především s jejich polárním transportem [159], v případě cytokininů byla tradičně připisována hlavně metabolickým přeměnám mezi aktivními a neaktivními formami.

Účelem této práce bylo ověřit specifitu membránových proteinů AtABCG14 a AtPUP14, které byly dříve navrženy jako možné selektivní přenašeče cytokininů, akumulacími experimenty na buněčné úrovni.

Identifikace proteinu AtABCG14 jako možného selektivního přenašeče cytokininů byla založena na výsledcích experimentů *in planta*, které se však nepodařilo potvrdit experimenty na buněčné úrovni [150,151]. Jelikož tyto experimenty byly prováděny s využitím kvasinkového expresního systému, autoři navrhuji, že funkce AtABCG14 je podmíněna specifickou posttranslační modifikací nebo asociací s jiným proteinem za vzniku heterodimeru.

Naše výsledky naznačují, že přenos cytokininů pomocí AtABCG14 nelze na buněčné úrovni pozorovat ani s využitím rostlinného (tabákového) expresního systému. Nabízí se tak hypotéza, že přenos cytokininů pomocí AtABCG14 je pletivově specifický a je regulován mechanismem, který se na buněčné úrovni nepodařilo napodobit. Vzhledem k pozorované lokalizaci AtABCG14 na cytoplasmatických membránách by se případně jednalo o regulaci posttranslační, která by spolu s převážně kořenovou lokalizací AtABCG14 i CYP735A2 zajišťovala pletivovou specifitu celého procesu exportu tZ do xylému. Jelikož CYP735A1 i CYP735A2 do jisté míry vznikají také v jiných pletivech, mohla by být přítomnost takového regulačního systému žádoucí pro odlišení buněk produkujících tZ určený k transportu na dlouhou vzdálenost od buněk produkujících tZ jako

možnou parakrinní signální molekulu [9,124]. Nelze vyloučit ani možnost, že podíl AtABCG14 na exportu tZ do xylému nespočívá v jeho přímém přenosu.

AtABCG14 není jediným z ABC přenašečů zapojených do transportu fytohormonů (viz 2.4.2) – AtABCB1 a AtABCB4 byly již dříve identifikovány mj. jako selektivní přenašeče auxinů [160]. Pomocí homologního modelování byla predikována jejich substrátová specifita a oblasti podílející se na přímé interakci s přenášenými látkami. Je možné, že by podobný přístup mohl přispět i k podrobnější charakterizaci vlastností AtABCG14, např. k posouzení, nakolik pravděpodobná je interakce intracelulárních domén AtABCG14 s tZ.

Afinita AtPUP14 vůči cytokininům se projevila nárůstem akumulovaného množství značené látky při indukci exprese příslušného genu. Tento nárůst je v souladu s předpokládanou funkcí AtPUP14 jako cytokininového importéru. Indukce exprese přenašeče AtPUP14 se projevila navýšením akumulace všech testovaných látek, a to jak ve formě volných bází, tak ve formě ribosidů. Zřejmě tedy došlo ke stimulaci transportního systému se širokou substrátovou specifitou, na němž se AtPUP14 podílí.

Možné preference AtPUP14 vůči testovaným substrátům lze diskutovat na základě výsledků akumulačních experimentů s přidavkem kompetujících sloučenin. Nejzajímavějším závěrem, který lze na základě dosažených výsledků učinit, jsou očividné kompetice mezi volnými bázemi a mezi ribosidy, nikoli však mezi jednou a druhou formou. Tyto výsledky nelze jednoduše vysvětlit případnou nespecifitou AtPUP14, neboť v takovém případě by musela být pozorována i kompetice mezi volnými bázemi a ribosidy navzájem. Nabízí se tak hypotéza předpokládající existenci minimálně dvou transportních systémů schopných současného přenosu různých forem cytokininů (popř. dalších purinových derivátů), nikoli však látek se stejnou formou a různým postranním řetězcem. Účast dvou systémů na transportu zajišťovaném obecně přenašeči z rodiny PUP navrhuje také autoři studie [141], s tím, že hlavní rozdíl mezi těmito dvěma systémy spatřují v jejich afinitě, nikoli specifitě vůči ribosidům či volným bázím.

Je také třeba zmínit, že v této práci nebyly studovány vlastnosti nespecifických přenašečů ENT, které by mohly mít podíl na transportu cytokininů ve formě ribosidů.

Jelikož je studium selektivního transportu cytokininů teprve v počátcích, brání širší interpretaci naměřených dat absence odpovídajícího kontextu. Přestože naše výsledky navrhované role AtABCG14 a AtPUP14 nepotvrdily, poukázaly na několik zajímavých skutečností, které by mohly mít vliv na směřování dalšího výzkumu v této oblasti.



## 7 Závěr

1. V transgenních buněčných kulturách BY-2 bylo ověřeno zvýšení exprese přenašečů AtABCG14 a AtPUP14 po indukci estradiolem. V případě AtABCG14 byla ověřena také jeho lokalizace na cytoplasmatické membráně.
2. Zvýšená exprese přenašeče AtPUP14 vedla k nespecifickému zvýšení akumulace radioaktivně značených cytokininů  $^3\text{H}$ -tZR a  $^3\text{H}$ -tZ v buňkách BY-2. Přídavek neznačeného cytokininu ve formě ribosidu k buňkám akumulujícím  $^3\text{H}$ -tZR vedl ke kompetici. Analogická kompetice nastala při přidavku neznačeného cytokininu ve formě volné báze k buňkám akumulujícím  $^3\text{H}$ -tZ.
3. Zvýšená exprese přenašeče AtABCG14 neměla na akumulaci značených cytokininů v buňkách BY-2 žádný pozorovatelný vliv.
4. V buňkách BY-2 docházelo k metabolickým přeměnám  $^3\text{H}$ -iP na adenin, iPRMP a tZRMP.  $^3\text{H}$ -iPR byl metabolizován za vzniku iPRMP a tZRMP,  $^3\text{H}$ -tZ a  $^3\text{H}$ -tZR převážně za vzniku tZRMP. Zvýšená exprese přenašeče AtPUP14 neměla na průběh metabolismu výrazný vliv.

## 8 Seznam použité literatury

1. Miller, C.O., Skoog, F., von Saltza, M.H., Strong, F.M. (1955) KINETIN, A CELL DIVISION FACTOR FROM DEOXYRIBONUCLEIC ACID. *J Am Chem Soc* **77**, 1392.
2. Zürcher, E., Müller, B. (2016) Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function—Advances and New Insights. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **324**, 1–38.
3. Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., von Saltza, M.H., Strong, F.M. (1956) Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division. *J Am Chem Soc* **78**, 1375–1380.
4. Miller, C.O., Skoog, F., Okumura, F.S., von Saltza, M.H., Strong, F.M. (1955) STRUCTURE AND SYNTHESIS OF KINETIN. *J Am Chem Soc* **77**, 2662–2663.
5. Letham, D.S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from. *Life Sci.* **2**, 569–73.
6. Miller, C.O. (1961) A Kinetin-Like Compound in Maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 170–174.
7. Plíhal, O., Szüčová, L., Galuszka, P. (2013) N9-substituted aromatic cytokinins with negligible side effects on root development are an emerging tool for in vitro culturing. *Plant Signal. Behav.* **8**, e24392.
8. Strnad, M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* **101**, 674–688.
9. Kieber, J.J., Schaller, G.E. (2014) Cytokinins. *Arab. Book* **12**, e0168.
10. Mok, M.C., Martin, R.C., Dobrev, P.I., Vanková, R., Ho, P.S., Yonekura-Sakakibara, K., Sakakibara, H., Mok, D.W.S. (2005) Topolins and Hydroxylated Thidiazuron Derivatives Are Substrates of Cytokinin O-Glucosyltransferase with Position Specificity Related to Receptor Recognition. *Plant Physiol.* **137**, 1057–66.
11. Schmitz, R.Y., Skoog, F., Playtis, A.J., Leonard, N.J. (1972) Cytokinins: Synthesis and Biological Activity of Geometric and Position Isomers of Zeatin'. *Plant Physiol* **50**, 702–705.
12. Spíchal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad, M., Schmölling, T. (2004) Two Cytokinin Receptors of Arabidopsis thaliana, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1299–1305.
13. Romanov, G.A., Lomin, S.N., Schmölling, T. (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J. Exp. Bot.* **57**, 4051–4058.
14. Bassil, N.V., Mok, D.W.S., Mok, M.C. (1993) Partial Purification of a cis-trans-Isomerase of Zeatin from Immature Seed of Phaseolus vulgaris L. *Plant Physiol.* **102**, 867–72.
15. Gajdošová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P.I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Žižková, E., Hanuš, J., Dančák, M., Trávníček, B., Pešek, B., Krupička, M., Vaňková, R., Strnad, M., Motyka, V. (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *J. Exp. Bot.* **62**, 2827–2840.
16. Kudo, T., Makita, N., Kojima, M., Tokunaga, H., Sakakibara, H. (2012) Cytokinin activity of cis-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative cis-Zeatin-O-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiol.* **160**, 319–31.
17. Hluska, T., Šebela, M., Lenobel, R., Frébort, I., Galuszka, P. (2017) Purification of Maize Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Casts Doubt on the Existence of Zeatin Cis–Trans Isomerase in Plants. *Front. Plant Sci.* **8**.
18. Richmond, A.E., Lang, A. (1957) Effect of Kinetin on Protein Content and Survival of Detached Xanthium Leaves. *Science* **125**, 650–51.
19. Benzioni, A., Mizrahi, Y., Richmond, A.E. (1974) Effect of Kinetin on Plant-Response to Salinity. *New Phytol.* **73**, 315–19.
20. O'Brien, J.A., Benková, E. (2013) Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Front. Plant Sci.* **4**.
21. Jordi, W., Schapendonk, A., Davelaar, E., Stoopen, G.M., Pot, C.S., De Visser, R., Rhijn, J.A.V., Gan, S., Amasino, R.M. (2000) Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell Environ.* **23**, 279–289.
22. Argyros, R.D., Mathews, D.E., Chiang, Y.-H., Palmer, C.M., Thibault, D.M., Etheridge, N., Argyros, D.A., Mason, M.G., Kieber, J.J., Schaller, G.E. (2008) Type B Response Regulators of Arabidopsis Play Key Roles in Cytokinin Signaling and Plant Development. *Plant Cell* **20**, 2102–16.
23. Kieber, J.J., Schaller, G.E. (2010) The Perception of Cytokinin: A Story 50 Years in the Making | Plant Physiology. *Plant Physiol.* **154**, 487–92.
24. Moubayidin, L., Di Mambro, R., Sabatini, S. (2009) Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends Plant Sci.* **14**, 557–62.
25. Guan, C., Wang, X., Feng, J., Hong, S., Liang, Y., Ren, B., Zuo, J. (2014) Cytokinin antagonizes abscisic acid-

- mediated inhibition of cotyledon greening by promoting the degradation of abscisic acid insensitive5 protein in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **164**, 1515–26.
26. Grossmann, K. (1991) Induction of leaf abscission in cotton is a common effect of urea- and adenine-type cytokinins. *Plant Physiol.* **95**, 234–7.
  27. Suttle, J.C. (1985) Involvement of ethylene in the action of the cotton defoliant thidiazuron. *Plant Physiol.* **78**, 272–6.
  28. Anzenbacherová, E., Janalík, J., Popa, I., Strnad, M., Anzenbacher, P. (2005) INTERACTION OF AROMATIC CYTOKININS WITH HUMAN LIVER MICROSOMAL CYTOCHROMES P450. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **149**, 349–351.
  29. Veselý, J., Havlíček, L., Strnad, M., Blow, J.J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D.S., Kato, J., Detivaud, L., Leclerc, S., Meijer, L. (1994) Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. *Eur. J. Biochem.* **224**, 771–786.
  30. Mok, M.C., Martin, R.C., Mok, D.W.S. (2000) Cytokinins: Biosynthesis, Metabolism and Perception. **36**, 102–7.
  31. Kakimoto, T. (2001) Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate:ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **42**, 677–685.
  32. Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., Sakakibara, H. (2004) Distinct Isoprenoid Origins of cis- and trans-Zeatin Biosyntheses in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **279**, 14049–54.
  33. Gerschenzon, J. (2002) v knize *Plant Physiology*, Taiz, L., Zeiger, E. (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA), s 283–308. 3. Vyd.
  34. Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2004) AtIPT3 is a Key Determinant of Nitrate-Dependent Cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1053–62.
  35. Spíchal, L. (2012) Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Funct. Plant Biol.* **39**, 267.
  36. Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., Kakimoto, T. (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16598–603.
  37. Lomin, S.N., Krivosheev, D.M., Steklov, M.Y., Arkhipov, D.V., Osolodkin, D.I., Schmölling, T., Romanov, G.A. (2015) Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *J. Exp. Bot.* **66**.
  38. Chen, C.-M., Kristopeit, S.M. (1981) Metabolism of Cytokinin: Deribosylation of Cytokinin Ribonucleoside by Adenosine Nucleosidase from Wheat Germ Cells. *Plant Physiol* **68**, 1020–1023.
  39. Chen, C.-M., Kristopeit, S.M. (1981) Metabolism of Cytokinin: DEPHOSPHORYLATION OF CYTOKININ RIBONUCLEOTIDE BY 5'-NUCLEOTIDASES FROM WHEAT GERM CYTOSOL. *Plant Physiol.* **67**, 494–8.
  40. Kudo, T., Kiba, T., Sakakibara, H. (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 53–60.
  41. Kopečná, M., Blaschke, H., Kopečný, D., Vigouroux, A., Koncítíková, R., Novák, O., Kotland, O., Strnad, M., Moréra, S., von Schwartzberg, K. (2013) Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides. *Plant Physiol.* **163**, 1568–83.
  42. Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., Kyojuka, J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–55.
  43. Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K., Sakakibara, H. (2009) Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 3152–69.
  44. Dzurová, L., Forneris, F., Savino, S., Galuszka, P., Vrabka, J., Frébort, I. (2015) The three-dimensional structure of “Lonely Guy” from *Claviceps purpurea* provides insights into the phosphoribohydrolase function of Rossmann fold-containing lysine decarboxylase-like proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **83**, 1539–1546.
  45. Seo, H., Kim, K.-J. (2017) Structural basis for a novel type of cytokinin-activating protein. *Sci. Rep.* **7**, 45985.
  46. Takei, K., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 41866–72.
  47. Åstot, C., Doležal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N.-H., Sandberg, G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14778–83.
  48. Krall, L., Raschke, M., Zenk, M.H., Baron, C. (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett.* **527**, 315–318.
  49. Kieber, J.J. (2002) v knize *Plant Physiology*, Taiz, L., Zeiger, E. (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA), s 493–517. 3. Vyd.

50. Sakakibara, H., Kasahara, H., Ueda, N., Kojima, M., Takei, K., Hishiyama, S., Asami, T., Okada, K., Kamiya, Y., Yamaya, T., Yamaguchi, S., Macmillan, J. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *PNAS* **102**, 9972–9977.
51. Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. (2001) Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *PNAS* **98**, 14837–14842.
52. Abe, I., Tanaka, H., Abe, T., Noguchi, H. (2007) Enzymatic formation of unnatural cytokinin analogs by adenylate isopentenyltransferase from mulberry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 795–800.
53. Sakano, Y., Okada, Y., Matsunaga, A., Suwama, T., Kaneko, T., Ito, K., Noguchi, H., Abe, I. (2004) Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* **65**, 2439–2446.
54. Sakamoto, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Yamamoto, Y., Nagasaki, H., Inukai, Y., Sato, Y., Matsuoka, M. (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiol.* **142**, 54–62.
55. Brugière, N., Humbert, S., Rizzo, N., Bohn, J., Habben, J.E. (2008) A member of the maize isopentenyl transferase gene family, *Zea mays* isopentenyl transferase 2 (ZmIPT2), encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development. *Plant Mol. Biol.* **67**, 215–229.
56. Schäfer, M., Brütting, C., Canales, I.M., Großkinsky, D.K., Vankova, R., Baldwin, I.T., Meldau, S. (2015) The role of cis-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. *J. Exp. Bot.* **66**, 4873–84.
57. Persson, B.C., Esberg, B., Ólafsson, Ó., Björk, G.R. (1994) Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie* **76**, 1152–60.
58. Martin, R.C., Mok, M.C., Shaw, G., Mok, D.W.S. (1989) An Enzyme Mediating the Conversion of Zeatin to Dihydrozeatin in Phaseolus Embryos 1. *Plant Physiol.* **90**, 1630–35.
59. Galuszka, P., Frébort, I., Šebela, M., Sauer, P., Jacobsen, S., Peč, P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? *Eur. J. Biochem.* **268**, 450–461.
60. Pačes, V., Werstiuik, E., Hall, R.H. (1971) Conversion of N6-(A2-Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue. *Plant Physiol* **48**, 775–778.
61. Jin, S.-H., Ma, X.-M., Kojima, M., Sakakibara, H., Wang, Y.-W., Hou, B.-K. (2013) Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences trans-zeatin homeostasis and trans-zeatin responses likely through O-glucosylation. *Planta* **237**, 991–999.
62. Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., Palme, K. (1993) Release of Active Cytokinin by a  $\beta$ -Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem Release of Active Cytokinin by a 1-Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem. *Source Sci. New Ser.* **262**11359, 1051–1054.
63. Kiran, N.S., Benková, E., Reková, A., Dubová, J., Malbeck, J., Palme, K., Brzobohatý, B. (2012) Retargeting a maize  $\beta$ -glucosidase to the vacuole – Evidence from intact plants that zeatin-O-glucoside is stored in the vacuole. *Phytochemistry* **79**, 67–77.
64. Hou, B., Lim, E.-K., Higgins, G.S., Bowles, D.J. (2004) N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47822–32.
65. Wang, J., Ma, X.-M., Kojima, M., Sakakibara, H., Hou, B.-K. (2011) N-Glucosyltransferase UGT76C2 is Involved in Cytokinin Homeostasis and Cytokinin Response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **52**, 2200–2213.
66. Wang, J., Ma, X.-M., Kojima, M., Sakakibara, H., Hou, B.-K. (2013) Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin N-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* **65**, 9–16.
67. Estruch, J.J., Chriqui, D., Grossmann, K., Schell, J., Spena, A. (1991) The plant oncogene rolC is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates cytokinin-3-glucosidase/plant oncogenes/rolC gene. *EMBO J.* **10**, 2889–2895.
68. Schmölling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E., Bartrina y Manns, I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant Res.* **116**, 241–252.
69. Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K., Schmölling, T. (2006) New Insights into the Biology of Cytokinin Degradation. *Plant Biol.* **8**, 371–381.
70. Motyka, V., Vaňková, R., Čapková, V., Petrášek, J., Kamínek, M., Schmölling, T. (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiol. Plant.* **117**, 11–21.
71. Malito, E., Coda, A., Bilyeu, K.D., Fraaije, M.W., Mattevi, A. (2004) Structures of Michaelis and Product Complexes of Plant Cytokinin Dehydrogenase: Implications for Flavoenzyme Catalysis. *J. Mol. Biol.* **341**, 1237–1249.

72. Frébortová, J., Fraaije, M.W., Galuszka, P., Sebela, M., Pec, P., Hrbáč, J., Novák, O., Bilyeu, K.D., English, J.T., Frébort, I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochem. J.* **380**, 121–30.
73. Hare, P.D., Staden, J. (1994) Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiol. Plant.* **91**, 128–136.
74. McGaw, B.A., Horgan, R. (1983) Cytokinin oxidase from Zea mays kernels and Vinca rosea crown-gall tissue. *Planta* **159**, 30–37.
75. Bilyeu, K.D., Cole, J.L., Laskey, J.G., Riekhof, W.R., Esparza, T.J., Kramer, M.D., Morris, R.O. (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**, 378–86.
76. Kakimoto, T. (1996) CKI1, a Histidine Kinase Homolog Implicated in Cytokinin Signal Transduction. *Source Sci. New Ser.* **274**, 982–985.
77. Hwang, I., Chen, H.-C., Sheen, J. (2002) Two-Component Signal Transduction Pathways in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129**, 500–515.
78. Heyl, A., Schmülling, T. (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 480–488.
79. Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 450–90.
80. Hejác, J., Ryu, H., Kim, G.-T., Dobešová, R., Choi, S., Choi, S.M., Souček, P., Horák, J., Pekárová, B., Palme, K., Brzobohatý, B., Hwang, I. (2009) The Histidine Kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 Regulate Vascular Tissue Development in Arabidopsis Shoots. *Plant Cell* **21**, 2008–21.
81. Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., Mizuno, T. (2001) The Arabidopsis AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1017–23.
82. Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., Kakimoto, T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* **409**, 1060–63.
83. Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., Helariutta, Y. (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev.* **14**, 2938–43.
84. Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., Mizuno, T. (2001) The Arabidopsis Sensor His-kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **42**, 107–13.
85. El-Showk, S., Ruonala, R., Helariutta, Y. (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 1373–83.
86. Heyl, A., Wulfetange, K., Pils, B., Nielsen, N., Romanov, G.A., Schmülling, T. (2007) Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol. Biol.* **7**, 62.
87. Zhulin, I.B., Nikolskaya, A.N., Galperin, M.Y. (2003) Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* **185**, 285–94.
88. Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2004) Molecular Characterization of Cytokinin-Responsive Histidine Kinases in Maize. Differential Ligand Preferences and Response to cis-Zeatin. *Plant Physiol.* **134**, 1654–61.
89. Vyroubalová, Š., Václavíková, K., Turečková, V., Novák, O., Šmehilová, M., Hluska, T., Ohnoutková, L., Frébort, I., Galuszka, P. (2009) Characterization of New Maize Genes Putatively Involved in Cytokinin Metabolism and Their Expression during Osmotic Stress in Relation to Cytokinin Levels. *Plant Physiol.* **151**, 433–47.
90. Martin, R.C., Mok, M.C., Habben, J.E., Mok, D.W.S. (2001) A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 5922–26.
91. Stolz, A., Riefler, M., Lomin, S.N., Achazi, K., Romanov, G.A., Schmülling, T. (2011) The specificity of cytokinin signalling in Arabidopsis thaliana is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant J.* **67**, 157–68.
92. Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M.R., Kakimoto, T. (2004) In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8821–26.
93. Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., Sakakibara, H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75–83.
94. Heyl, A., Riefler, M., Romanov, G.A., Schmülling, T. (2012) Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 246–256.
95. Miyata, S., Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998) Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPt domain in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* **437**, 11–14.
96. Suzuki, T., Sakurai, K., Ueguchi, C., Mizuno, T. (2001) Two Types of Putative Nuclear Factors that Physically

- Interact with Histidine-Containing Phosphotransfer (Hpt) Domains, Signaling Mediators in His-to-Asp Phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 37–45.
97. Punwani, J.A., Hutchison, C.E., Schaller, G.E., Kieber, J.J. (2010) The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *Plant J.* **62**, 473–82.
  98. Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Törmäkangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T., Helariutta, Y. (2006) Cytokinin Signaling and Its Inhibitor AHP6 Regulate Cell Fate During Vascular Development. *Science* **311**, 94–98.
  99. Müller, B., Sheen, J. (2007) *Arabidopsis* Cytokinin Signaling Pathway. *Sci. STKE* **2007**, cm5–cm5.
  100. Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J. (2006) The *Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling. *Plant Cell* **18**, 3073–87.
  101. Müller, B. (2011) Generic signal-specific responses: cytokinin and context-dependent cellular responses. *J. Exp. Bot.* **62**, 3273–88.
  102. Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T., Yamazaki, T. (2002) Molecular Structure of the GARP Family of Plant Myb-Related DNA Binding Motifs of the *Arabidopsis* Response Regulators. *Plant Cell* **14**, 2015–29.
  103. Imamura, A., Kiba, T., Tajima, Y., Yamashino, T., Mizuno, T. (2003) In Vivo and In Vitro Characterization of the ARR11 Response Regulator Implicated in the His-to-Asp Phosphorelay Signal Transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **44**, 122–31.
  104. Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Bäurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schäfer, E., Kudla, J., Harter, K. (2001) The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial Complex I in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics* **265**, 2–13.
  105. Sakai, H., Aoyama, T., Oka, A. (2000) *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J.* **24**, 703–11.
  106. Mason, M.G., Li, J., Mathews, D.E., Kieber, J.J., Schaller, G.E. (2004) Type-B Response Regulators Display Overlapping Expression Patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**, 927–37.
  107. D’Agostino, I.B., Deruère, J., Kieber, J.J. (2000) Characterization of the Response of the *Arabidopsis* Response Regulator Gene Family to Cytokinin. *Plant Physiol.* **124**, 1706–17.
  108. Imamura, A., Yoshino, Y., Mizuno, T. (2001) Cellular Localization of the Signaling Components of *Arabidopsis* His-to-Asp Phosphorelay. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2113–17.
  109. Kiba, T., Yamada, H., Mizuno, T. (2002) Characterization of the ARR15 and ARR16 Response Regulators with Special Reference to the Cytokinin Signaling Pathway Mediated by the AHK4 Histidine Kinase in Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1059–66.
  110. Kiba, T., Yamada, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Yamashino, T., Mizuno, T. (2003) The Type-A Response Regulator, ARR15, Acts as a Negative Regulator in the Cytokinin-Mediated Signal Transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **44**, 868–74.
  111. Osakabe, Y., Miyata, S., Urao, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) Overexpression of *Arabidopsis* response regulators, ARR4/ATRR1/IBC7 and ARR8/ATRR3, alters cytokinin responses differentially in the shoot and in callus formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 806–15.
  112. Ren, B., Liang, Y., Deng, Y., Chen, Q., Zhang, J., Yang, X., Zuo, J. (2009) Genome-wide comparative analysis of type-A *Arabidopsis* response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling. *Cell Res.* **19**, 1178.
  113. To, J.P.C., Deruère, J., Maxwell, B.B., Morris, V.F., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., Kieber, J.J. (2007) Cytokinin Regulates Type-A *Arabidopsis* Response Regulator Activity and Protein Stability via Two-Component Phosphorelay. *Plant Cell* **19**, 3901–14.
  114. Kim, H.J., Kieber, J.J., Schaller, G.E. (2013) The rice F-box protein KISS ME DEADLY2 functions as a negative regulator of cytokinin signalling. *Plant Signal. Behav.* **8**.
  115. Kim, H.J., Chiang, Y.-H., Kieber, J.J., Schaller, G.E. (2013) SCFKMD controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 10028–33.
  116. Gattolin, S., Alandete-Saez, M., Elliott, K., Gonzalez-Carranza, Z., Naomab, E., Powell, C., Roberts, J.A. (2006) Spatial and temporal expression of the response regulators ARR22 and ARR24 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **57**, 4225–33.
  117. Horák, J., Grefen, C., Berendzen, K.W., Hahn, A., Stierhof, Y.-D., Stadelhofer, B., Stahl, M., Koncz, C., Harter, K. (2008) The *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. *BMC Plant Biol.* **8**, 77.
  118. Cutcliffe, J.W., Hellmann, E., Heyl, A., Rashotte, A.M. (2011) CRFs form protein–protein interactions with each

- other and with members of the cytokinin signalling pathway in Arabidopsis via the CRF domain. *J. Exp. Bot.* **62**, 4995–5002.
119. Rashotte, A.M., Mason, M.G., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., Kieber, J.J. (2006) A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11081–85.
  120. Zwack, P.J., De Clercq, I., Howton, T.C., Hallmark, H.T., Hurny, A., Keshishian, E.A., Parish, A.M., Benkova, E., Mukhtar, M.S., Van Breusegem, F., Rashotte, A.M. (2016) Cytokinin Response Factor 6 Represses Cytokinin-Associated Genes during Oxidative Stress. *Plant Physiol.* **172**, 1249–58.
  121. Abo-Hamed, S., Collin, H.A., Hardwick, K. (1984) BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF LEAF DEVELOPMENT IN COCOA (THEOBROMA CACAO L.). VIII. EXPORT AND DISTRIBUTION OF <sup>14</sup>C AUXIN AND KININ FROM THE YOUNG AND MATURE LEAVES. *New Phytol.* **97**, 219–25.
  122. Davey, J.E., Staden, J. (1981) Cytokinin activity in *Lupinus albus*. V. Translocation and metabolism of {8-<sup>14</sup>C}zeatin applied to the xylem of fruiting plants. *Physiol. Plant.* **51**, 45–48.
  123. Corbesier, L., Prinsen, E., Jacqumard, A., Lejeune, P., Van Onckelen, H., Périlleux, C., Bernier, G. (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana during floral transition. *J. Exp. Bot.* **54**, 2511–17.
  124. Faiss, M., Zalubilová, J., Strnad, M., Schmülling, T. (1997) Conditional transgenic expression of the ipt gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J.* **12**, 401–15.
  125. Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., Kakimoto, T. (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20027–31.
  126. Kiba, T., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H. (2013) Side-Chain Modification of Cytokinins Controls Shoot Growth in Arabidopsis. *Dev. Cell* **27**, 452–61.
  127. Samuelson, M.E., Eliasson, L., Larsson, C.-M. (1992) Nitrate-Regulated Growth and Cytokinin Responses in Seminal Roots of Barley. *Plant Physiol.* **98**, 309–15.
  128. Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M., Sugiyama, T. (2001) Nitrogen-Dependent Accumulation of Cytokinins in Root and the Translocation to Leaf: Implication of Cytokinin Species that Induces Gene Expression of Maize Response Regulator. *Plant Cell Physiol.* **42**, 85–93.
  129. Sakakibara, H., Suzuki, M., Takei, K., Deji, A., Taniguchi, M., Sugiyama, T. (1998) A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *Plant J.* **14**, 337–44.
  130. Durán-Medina, Y., Díaz-Ramírez, D., Marsch-Martínez, N. (2017) Cytokinins on the Move. *Front. Plant Sci.* **8**.
  131. Kang, J., Lee, Y., Sakakibara, H., Martinoia, E. (2017) Cytokinin Transporters: GO and STOP in Signaling. *Trends Plant Sci.* **22**, 455–61.
  132. Chang, L., Ramireddy, E., Schmülling, T. (2015) Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **66**, 4759–68.
  133. Chickarmane, V.S., Gordon, S.P., Tarr, P.T., Heisler, M.G., Meyerowitz, E.M. (2012) Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical–basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4002–7.
  134. Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., Kakimoto, T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* **37**, 128–38.
  135. Zürcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkerli, K., Tarr, P.T., Müller, B. (2013) A Robust and Sensitive Synthetic Sensor to Monitor the Transcriptional Output of the Cytokinin Signaling Network in Planta. *Plant Physiol.* **161**, 1066–75.
  136. Gillissen, B., Bürkle, L., André, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B., Frommer, W.B. (2000) A New Family of High-Affinity Transporters for Adenine, Cytosine, and Purine Derivatives in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 291–300.
  137. Hildreth, S.B., Gehman, E.A., Yang, H., Lu, R.-H., K C, R., Harich, K.C., Yu, S., Lin, J., Sandoe, J.L., Okumoto, S., Murphy, A.S., Jelesko, J.G. (2011) Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18179–84.
  138. Szydlowski, N., Bürkle, L., Pourcel, L., Moulin, M., Stolz, J., Fitzpatrick, T.B. (2013) Recycling of pyridoxine (vitamin B6) by PUP1 in Arabidopsis. *Plant J.* **75**, 40–52.
  139. Girke, C., Daumann, M., Niopek-Witz, S., Möhlmann, T. (2014) Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Front. Plant Sci.* **5**.
  140. Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C., Frommer, W.B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. *Plant J.* **34**, 13–26.

141. Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B., Frommer, W.B. (2008) Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in Arabidopsis Cell Cultures.
142. Zürcher, E., Liu, J., di Donato, M., Geisler, M., Müller, B. (2016) Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science* **353**, 1027–30.
143. Li, J., Wang, D. (2000) Cloning and in vitro expression of the cDNA encoding a putative nucleoside transporter from Arabidopsis thaliana. *Plant Sci.* **157**, 23–32.
144. Möhlmann, T., Mezher, Z., Schwerdtfeger, G., Neuhaus, H.E. (2001) Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from Arabidopsis thaliana (ENT1,At). *FEBS Lett.* **509**, 370–74.
145. Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2005) Functional Characterization and Expression Analysis of a Gene, OsENT2, Encoding an Equilibrative Nucleoside Transporter in Rice Suggest a Function in Cytokinin Transport. *Plant Physiol.* **138**, 196–206.
146. Sun, J., Hirose, N., Wang, X., Wen, P., Xue, L., Sakakibara, H., Zuo, J. (2005) Arabidopsis SOI33/AtENT8 Gene Encodes a Putative Equilibrative Nucleoside Transporter That Is Involved in Cytokinin Transport In Planta. *J. Integr. Plant Biol.* **47**, 588–603.
147. Li, G., Liu, K., Baldwin, S.A., Wang, D. (2003) Equilibrative Nucleoside Transporters of Arabidopsis thaliana cDNA CLONING, EXPRESSION PATTERN, AND ANALYSIS OF TRANSPORT ACTIVITIES. *J. Biol. Chem.* **278**, 35732–42.
148. Traub, M., Flörchinger, M., Piecuch, J., Kunz, H., Weise-Steinmetz, A., Deitmer Joachim W., Ekkehard Neuhaus H., Möhlmann Torsten (2007) The fluorouridine insensitive 1 (fur1) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **49**, 855–64.
149. Wormit, A., Traub, M., FLÖRCHINGER, M., Neuhaus, H.E., MÖHLMANN, T. (2004) Characterization of three novel members of the Arabidopsis thaliana equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochem. J.* **383**, 19–26.
150. Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K.Y., Kwon, M., Endler, A., Song, W.-Y., Martinoia, E., Sakakibara, H., Lee, Y. (2014) Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7150–5.
151. Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., Liu, C.-J. (2014) Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat. Commun.* **5**, 1–12.
152. Borghi, L., Kang, J., Ko, D., Lee, Y., Martinoia, E. (2015) The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 924–30.
153. Hwang, J.-U., Song, W.-Y., Hong, D., Ko, D., Yamaoka, Y., Jang, S., Yim, S., Lee, E., Khare, D., Kim, K., Palmgren, M., Yoon, H.S., Martinoia, E., Lee, Y. (2016) Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle. *Mol. Plant* **9**, 338–55.
154. Rajs, A., Warzybok, A., Migocka, M. (2016) Genes Encoding Cucumber Full-Size ABCG Proteins Show Different Responses to Plant Growth Regulators and Sclareolide. *Plant Mol. Biol. Report. Ispmb* **34**, 720–36.
155. Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S. (1992) in *International Review of Cytology*, Jeon, K.W., Friedlander, M. (Academic Press), s 1–30.
156. Nagata, T., Kumagai, F. (1999) Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods Cell Sci.* **21**, 123–27.
157. Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–72.
158. Ivanov Dobrev, P., Kamínek, M. (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **950**, 21–29.
159. Blakeslee, J.J., Peer, W.A., Murphy, A.S. (2005) Auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 494–500.
160. Geisler Markus, Murphy Angus S. (2005) The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett.* **580**, 1094–1102.



Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka